

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MUSEU NACIONAL

**Filogenia molecular de *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini)
com uma análise morfométrica craniana do gênero**

Júlio Fernando Vilela

Dissertação apresentada à Coordenação de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Zoologia), Museu Nacional, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Zoologia)

Orientadores: João Alves de Oliveira

Cibele Rodrigues Bonvicino

Rio de Janeiro

Março 2005

Júlio Fernando Vilela

Filogenia molecular de *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini) com uma análise morfométrica craniana do gênero.

Banca Examinadora:

Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino
(Presidente da Banca)

Dr. Miguel Angelo M. Moreira

Dr. Luiz Flamarion de Oliveira

Data da defesa: 29 de março de 2005

Trabalho desenvolvido no Setor de Mastozoologia do Departamento de Vertebrados do
Museu Nacional – UFRJ.

Orientadores:

Dr. João Alves de Oliveira

Departamento de Vertebrados – Setor de Mastozoologia – Museu Nacional – UFRJ

Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Divisão de Genética – Instituto Nacional de Câncer – INCA

FICHA CATALOGRÁFICA

VILELA, Júlio Fernando

Filogenia molecular de *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini) com uma análise morfométrica craniana do gênero.

Rio de Janeiro, UFRJ, Museu Nacional, 2005. xvi+67 pp.

Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia).

Palavras-chave: 1. *Brucepattersonius* 2. Akodontini 3. Filogenia 4. cit b 5. Taxonomia

6. Sistemática 7. Morfometria 8. Floresta Atlântica 9. Universidade Federal do Rio de Janeiro

10. Teses.

Natural abilities are like natural plants: they need pruning by study

Habilidades naturais são como as plantas: precisam de ser podadas pelo estudo

Francis Bacon (1561-1626)

Filósofo Inglês

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Licério e Rita de Cássia pela educação essencial, meu irmão, minhas irmãs, em especial à Magda, cunhados e sobrinhos pelos momentos “extra-tese” os quais foram muito valiosos.

A minha namorada Flavinha Casado por estar ao meu lado, incondicionalmente em todos os momentos desta jornada. Ao Sr. Flávio e D. Iria pela amizade e acolhida.

Aos Drs. Cibele R. Bonvicino e João A. de Oliveira, pela orientação, amizade e acima de tudo: confiança.

Ao Dr. Hector Seuánez Abreu por mais uma vez ter disponibilizado meu acesso irrestrito às instalações da Divisão de Genética do INCA sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

À Dra. Leila Maria Pessoa por disponibilizar meu acesso às instalações do Laboratório de Mastozoologia – UFRJ.

À Dra. Lena Geise e Valéria P. Firme pela amizade e pelas amostras.

Ao LABVERT – UFRJ através da pessoa da Dra. Lena Geise por ceder o material do Vale das Antas – Teresópolis.

A Pablo R. Gonçalves e Liliani M. Tiepolo, pelo companherismo, amizade, dicas e amostras para esta dissertação.

À Dra. Renata Pardini e Laura Naxara por disponibilizarem material para esta tese.

À Gabriela Paise pela disponibilização da amostra de Maquiné.

Ao Dr. James Patton pelas seqüências gentilmente cedidas.

À Stella Maris Franco e Sérgio Maia Vaz pela ajuda ao acesso do material da coleção de Mamíferos do Museu Nacional.

A. Rogério Rossi (Sal) pela paciência e atenção dispensadas durante as visitas ao MZUSP.

À Dra. Olga Beatriz Vaccaro pela permissão da visita e ajuda na Coleção de Mamíferos do Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia.

Aos professores do Museu Nacional, em especial aos Drs. Paulo A. Buckup, Marcos Raposo, Ronaldo Fernandes, e Luiz Flamarion Oliveira, e também ao Dr. Antônio Bernardo de Carvalho Oliveira do Programa de Pós-graduação em Genética da UFRJ pelos ensinamentos e/ou discussões que certamente foram importantes para o meu desenvolvimento no decorrer deste curso.

Ao corpo de pesquisadores do Inca, Drs. Fernando Vargas, Denise A. Pereira, Alessandra Splendore, pela amizade e em especial ao Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira pelas dicas e discussões de diversos temas ligados ou não a esta dissertação, e à Aline Moreira pelas dicas e pela alegria diária e intermitente.

Aos Drs. Paulo Sérgio D'Andrea, Arnaldo Maldonado Júnior e Rosana Gentile, do Laboratório de Controle da Esquistossomose (LBCE, Fiocruz) pela amizade e troca de idéias e conselhos que de certa forma contribuíram para meu desenvolvimento.

Aos grandes amigos Harley S. da Silva, Albert de Menezes e todos aqueles do Museu Nacional que compartilharam esta caminhada: André, Andréia, Aniela Manco, Aninha Lazar, Fabiana Caramaschi, Fabrício Escarlante e Rafael Lames.

Ao pessoal do Inca: Ana Beatriz, Ana Flávia, Andressa Durans, Arissa Ikeda, Emmerson Costa, Esteban Braggio, Cláudio Vieira, Fábio Baldi, Fabícia Nascimento, Fernanda Aguiar, Giovana Gontijo, Íris Pires, Juliano Javert, Kelly Rose (minha maninha), Leila, Leila Monerat, Livia Rosa, Luciana Lassance, Luciana Nogueira, Maria Clara, Michelle de Oliveira, Patrícia Guimarães, Raphael Curvo, Raquel da Hora, Ricardo Krapp, Rosa Rita, Thaís Sholl.

À família LBCE: Fabiano Fernandes “Mestre” e sua esposa Renata Coura (mesmo distantes eram onipresentes), Vanderson Corrêa Vaz, Bernardo Rodrigues Teixeira, André

Roque, Marcony Gerardi, Simone e todos aqueles que fazem ou fizeram parte deste LABORATÓRIO como Carol Fernandes, Tatiana Freitas, Vitor Rademaker, Natalie Olifers, Juberlan Garcia, André Campos, Neto, Felipe e ao “Chefe” Wandique.

Às amigas da UERJ, Paula Soares e Luciana Guedes.

Ao Brás Fernando pela ajuda nos PARNA de Aparados da Serra e Serra Geral e pelos momentos de alegria nestas coletas.

Ao grande amigo Rogério Ajub pela amizade e pela troca de idéias extra-tese.

Ao Jadir e Sandra pela companhia e estada em “Sampa” durante as visitas ao MZUSP.

Ao Dr. Bruce Patterson pelas separatas que me foram úteis na confecção desta dissertação.

Ao Mário de Vivo pelo suporte às coletas realizadas nos PARNA de Aparados da Serra e Serra Geral através do projeto Biota da FAPESP e pelo acesso à coleção de Mamíferos do MZUSP.

Ao IBAMA pelas licenças de coleta e aos Chefes dos Parques Nacionais Estevão José Marchesini Fonseca (Caparaó) e Renzo (Aparados da Serra e Serra Geral), pelo suporte e liberação do acesso à estas áreas.

À Francisco Gonzalez (PROBAN) pelo suporte dado à participação nas XIX Jornadas Argentinas de Mastozoologia e visita à Coleção de Mamíferos do M.A.C.N. Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo auxílio concedido ao processo 477408/2001 à J. A. Oliveira e C. R. Bonvicino.

RESUMO

Filogenia molecular de *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini) com uma análise morfométrica craniana do gênero.

Júlio Fernando Vilela

Orientadores: João A. de Oliveira e Cibele Rodrigues Bonvicino

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Para identificar unidades evolutivas no gênero *Brucepattersonius* e propor uma hipótese filogenética, foram realizadas análises morfológicas e moleculares para amostras representando uma ampla área da distribuição do gênero. Ambas análises revelaram a presença de cinco linhagens evolutivas independentes entre as amostras disponíveis: A linhagem “A”, do Maciço do Caparaó, Minas Gerais, revelou-se composta apenas por uma espécie, *B. griserufescens*, uma vez que o holótipo de *B. albinasus*, descrita para a mesma localidade, não se distinguiu dela em termos moleculares (Citocromo b). A linhagem “B”, das serras dos Órgãos e da Mantiqueira (Rio de Janeiro e Minas Gerais), não pôde ser associada a qualquer das formas nominais disponíveis. A linhagem “C”, reuniu amostras de São Paulo a um haplótipo que ocorreu em simpatria com espécimes da linhagem “B” da Serra da Mantiqueira. A linhagem “D”, composta por indivíduos de Aratiba, Rio Grande do Sul, foi associada em termos morfométricos a uma das três espécies descritas para a província de Misiones, Argentina. A linhagem “E”, composta por um indivíduo de Urubici, Santa Catarina, revelou-se uma espécie divergente ainda não descrita. Estas cinco unidades, restritas ao domínio morfoclimático da Floresta Atlântica, apresentaram uma forte estruturação geográfica: um grupo mais basal, com distribuição predominantemente ao sul, sendo o haplótipo diferente da Serra da Mantiqueira uma provável extensão dele; uma forma isolada na Serra Geral em Santa Catarina; e um grupo mais derivado, com duas espécies, uma do Maciço do Caparaó, e outra das serras dos Órgãos e da Mantiqueira.

ABSTRACT

Molecular Phylogeny of *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini) with a morphometric skull analysis of the genus

Júlio Fernando Vilela

Orientadores: João A. de Oliveira e Cibele Rodrigues Bonvicino

Abstract da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

In the attempt to identify evolutionary units in the genus *Brucepattersonius* and to propose a phylogenetic hypothesis for them, morphometric and molecular analyses were carried out on samples encompassing a wide area of the distribution of the genus. Both analyses sorted the available samples into five independent units: Lineage “A”, from the Caparaó massif, state of Minas Gerais, was shown to belong to only one species, namely *B. griserufescens*, in as much as the holotype of *B. albinasus*, described for the same locality, was not distinct from it in molecular terms (cyt. b sequence). Lineage “B”, from Órgãos and Mantiqueira mountains (Rio de Janeiro and Minas Gerais), could not be assigned to any of the available nominal forms in the genus. Lineage “C”, clustered samples from São Paulo states to an haplotype that occurred in sympatry with specimens of Lineage “B” from Mantiqueira mountains. Lineage “D”, composed by specimens from Aratiba, state of Rio Grande do Sul, was shown to be morphometrically related to one of the three species described from the province of Misiones, Argentina. Lineage “E”, represented by a sole specimen from Urubici, state of Santa Catarina, is a divergent undescribed form. These five units, restricted to the Atlantic Forest morphoclimatic domain, have shown a strong geographic structure: a basal group, predominantly meridional in distribution, with an offshot dispersed into the Mantiqueira mountains; an isolated form in the Serra Geral of Santa Catarina; and a more derived group, with two species, one from the Caparaó massif, and the another from Órgãos and Mantiqueira mountains.

Key words: *Brucepattersonius*, akodontini, phylogeny, cit *b*, taxonomy, systematics, morphometry, atlantic forest.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 – Material utilizado	6
2.2 – Análises morfométricas.....	12
2.2.1 – Medidas cranianas.....	12
2.2.2 – Estimativa dos dados ausentes	13
2.2.3 – Separação de amostras com base no número amostral	13
2.2.4 – Análises multivariadas	16
2.2.4.1 – Análise de componentes principais.....	16
2.2.4.2 – Análise discriminante canônica.....	16
2.2.4.3 – Distâncias multivariadas entre amostras	17
2.2.4.4 – Análise de agrupamento das amostras “grandes”	17
2.2.4.5 – Classificação <i>a posteriori</i> de amostras “pesquenas”	17
2.3 – Análise citogenética	18
2.4 – Análises moleculares.....	18
2.4.1 – Obtenção das seqüências de ADN	18
2.4.2 – Análises filogenéticas.....	21
2.4.3 – Análises de variação morfológicas e moleculares dentro de linhagens	22
3 – RESULTADOS.....	24
3.1 – Análises morfológicas.....	24

3.1.1. – Estatística descritiva da variabilidade craniana entre população	24
3.1.2. – Análise multivariadas.....	27
3.2 – Análises citogenéticas	33
3.3 – Análises moleculares.....	34
3.4 – Análises de variação morfológica e molecular dentro de linhagens	42
4 – DISCUSSÃO.....	51
5 – CONCLUSÕES.....	57
6 – BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXO I – Protocolo para Cariótipo	61
Parte I – Obtenção das células em suspensão	61
Parte II – Obtenção dos cariótipos	63
ANEXO II – Protocolo para extração de ADN -	64
Parte I – Extração com “GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit”	64
Parte II – Técnica de Fenol-Clorofórmio	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Brucepattersonius griserufescens</i> (♀ PRG1192) do P. N. do Caparaó.....	3
Figura 2. Mapa com as localidades de ocorrência de <i>Brucepattersonius</i>	11
Figura 3. Dezenove medidas cranianas aferidas neste estudo.....	12
Figura 4. Localização dos iniciadores utilizados neste trabalho dentro da sequência do gene citocromo <i>b</i>	19
Figura 5. Diagrama da distribuição dos escores individuais interpolados de cada amostra “grande” no espaço multivariado definido pelos componentes principais.	28
Figura 6. Diagrama da distribuição dos escores individuais interpolados de cada amostra “grande” no espaço multivariado definido pelas variáveis canônicas e suas correlações vetoriais com as medidas cranianas.....	31
Figura 7. Coloração convencional com Giemsa do cariótipo de <i>Brucepattersonius</i> sp.(♂ JAO 967) de Piraquara, PR. 2n = 52, NFa = 52. XY cromossomos sexuais.....	33
Figura 8. Topologia da análise de <i>agrupamentos vizinhos</i> com modelo de substituição de bases K-2p... ..	39
Figura 9. Árvore de consenso estrito das 260434 árvores mais parcimoniosas obtida através da análise de parcimônia.....	40
Figura 10 – Árvore de verossimilhança máxima gerada seguindo o modelo evolutivo GTR+I+G.....	41
Figura 11. Análise discriminante canônica e correlações vetoriais com as variáveis originais, mostrando a separação dos grupos de indivíduos da Serra da Mantiqueira e Serra dos Órgãos.....	44
Figura 12. Comparação entre os agrupamentos formados pelo método de UPGMA baseado nas distâncias de Mahalanobis e a árvore de parcimônia máxima com apenas alguns	

táxons representando os grupamentos gerados pela análise de verossimilhança máxima	45
Figura 13. Componentes principais dos quatro grupos baseados na verossimilhança.....	46
Figura 14. Análises discriminantes canônicas e correlações vetoriais dos quatro grupos baseados na verossimilhança.	47
Figura 15. Rede de <i>Median-joining</i> referente às populações da Serra dos Órgãos e Serra da Mantiqueira, linhagem B com inclusão do haplótipo LG 123 da linhagem C.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Totais de indivíduos utilizados nas análises morfométricas destacando-se o número de medidas ausentes.	13
Tabela 2. Localidades de proveniência das amostras “grandes” ($n \geq 4$), tamanho amostral e sexo dos indivíduos utilizados nas análises morfométricas.....	14
Tabela 3. Localidades de proveniência das amostras “pequenas” ($n < 4$), tamanho amostral e sexo dos indivíduos.....	15
Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação e seqüenciamento dos 1140 pb do gene mitocondrial citocromo <i>b</i>	20
Tabela 5. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo (entre parênteses), e número de indivíduos medidos para cada variável em cada uma das amostras “grandes”	25
Tabela 6. Probabilidades de alocação (%) das amostras “pequenas” (linhas) às amostras “grandes” (colunas) baseadas na freqüência de ocorrência das menores distâncias de Mahalanobis obtidos em 1000 replicações de <i>bootstrap</i>	32
Tabela 7. Lista das amostras seqüenciados neste estudo indicando o número de museu, número original e o número de pares de bases (pb) seqüenciados, especificando a base de início, interrupção e fim.....	34
Tabela 8. Estimativas de distância p, em negrito estimativas entre espécimes da mesma localidade, nas células sombreadas estimativas entre espécimes supostamente da mesma espécie. Letras nos quadrados indicam as linhagens apontadas nas outras análises moleculares.	37

1 – Introdução

Os roedores da família Sigmodontinae estão distribuídos predominantemente na América do Sul com cerca de 60 gêneros endêmicos, constituindo o grupo mais diversificado e complexo de mamíferos do Novo Mundo (D'ELIA, 2003). A tribo akodontini compõe um grupo monofilético, endêmico e altamente diversificado de gêneros de Sigmodontinae, entre os quais se situa o gênero *Brucepattersonius* (HERSHKOVITZ, 1998).

O gênero *Brucepattersonius* compreende espécies semi-fossoriais encontradas em hábitat de floresta e campos de altitude endêmicas da Mata Atlântica do sudeste e sul do Brasil e da região de Misiones na Argentina. No Brasil distribui-se dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais até o do Rio Grande do Sul, ocorrendo em todos os estados das regiões Sudeste e Sul. Nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais se encontra em geral associado às maiores elevações da Mata Atlântica, respectivamente ao Maciço do Caparaó e às escarpas da Serra dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira, esta última contando com registros também no estado de São Paulo. A partir de São Paulo a distribuição de *Brucepattersonius* abrange áreas mais extensas e de menor altitude, sendo que nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul sua distribuição estende-se à localidades situadas ao nível do mar. Na Argentina são conhecidos registros apenas da província de Misiones, área também caracterizada pelo domínio de Mata Atlântica (HERSHKOVITZ 1998, MARES & BRAUN 2000).

Uma parte considerável da diversidade incluída no gênero *Brucepattersonius* por HERSHKOVITZ (1998) foi por mais de um século representada por uma única espécie, descrita originalmente como *Oxymycterus iheringi* Thomas, 1896. Porém, ao longo de sua história taxonômica estes indivíduos já estiveram alocados nos gêneros *Hesperomys* (Waterhouse), *Microxus* (Thomas) e *Akodon* (Meyen) devido à sobreposição de características

comuns a cada um deles. Em relação a estes gêneros, "*Oxymycterus*" *iheringi* se assemelhava por apresentar o rostro alongado, zigomático baixo e amplamente mais largo que a caixa craniana, interparietal reduzido e palato largo dentre outros caracteres akodontinos.

Contudo, este táxon compartilhava alguns caracteres mais associados ao gênero *Oxymycterus*, como caixa craniana relativamente baixa, projeção do tubo muito pronunciado, com o nasal ultrapassando em muito a linha dos incisivos, palato menor que na maioria dos Akodontinos, placa zigomática com forte inclinação, além de caracteres externos como unhas relativamente desenvolvidas e curvas, e olhos reduzidos que contribuíram para que fosse re-incluído neste gênero (Fig. 1) (MASSOIA, 1963; MASSOIA & FORNES, 1969; HINOJOSA *et al.*, 1987).

Outros caracteres presentes unicamente no gênero *Oxymycterus* como ossificações pré-nasais, nasais desenvolvidos em forma de trompete dorsalmente achatados, tamanho corporal maior e patas mais fortes, de certa forma contribuíram para o reconhecimento de "*Oxymycterus*" *iheringi* como uma espécie representante de um novo gênero (HERSHKOVITZ, 1998).

Conseqüentemente o gênero *Brucepattersonius* foi criado por HERSHKOVITZ (1998) para incluir a espécie *O. iheringi* além de quatro outras espécies até então inéditas, a saber: *B. soricinus*, *B. iginiventris*, *B. griserufescens* e *B. albinasus*, todas descritas de localidades brasileiras. Três outras espécies *B. paradisus*, *B. misionensis* e *B. guarani* foram posteriormente descritas para três localidades adjacentes no distrito de Guarani, província de Misiones, Argentina (MARES & BRAUN, 2000). A espécie fóssil *Oxymycterus talpinus* Winge, 1888, pertencente ao conjunto faunístico Pleisto / Holocênico de Lagoa Santa, Minas Gerais, foi relacionada à *O. iheringi* por THOMAS (1896) e por OLIVEIRA (1998), com base em comparações com *Oxymycterus iheringi* (= *B. iheringi*).



Figura 1. *Bucepattersonius griserufescens* (♀ PRG1192) do P. N. do Caparaó.

Em todas as espécies recém-descritas, as descrições são em geral muito reduzidas, baseadas em poucos (às vezes únicos) espécimes e não fundamentadas em revisão abrangente do material disponível em coleções, sem que tenham sido conduzidos estudos no sentido de avaliar a extensão e magnitude da variação morfológica e genética no gênero.

A distinção taxonômica de *Bucepattersonius* relativamente recente e o tardio reconhecimento de sua diversidade taxonômica são provavelmente decorrentes de sua parca representatividade em coleções, aliada à documentada dificuldade de delimitação de espécies em bases morfológicas e citogenéticas. Apenas recentemente amostras mais abrangentes da ampla distribuição do gênero têm sido obtidas e depositadas nos museus.

Estudos citogenéticos têm revelado a homogeneidade no número diplóide para o gênero *Brucepattersonius* ($2n = 52$), bem como uma diferença em relação ao cariótipo de *Oxymycterus*, gênero ao qual *B. iheringi* vinha sendo associado até recentemente, e que também se caracteriza pela homogeneidade cariotípica ($2n = 54$) (VITULLO, 1986; SVARTMAN & CARDOSO DE ALMEIDA, 1993; BONVICINO *et al.* 1998; MARES & BRAUN, 2000).

A diversidade genética em amostras do gênero *Brucepattersonius* já foi objeto de estudo em análises filogenéticas baseadas no gene mitocondrial citocromo *b* (SMITH & PATTON, 1999; D'ELIA, 2003; D'ELIA *et al.*, 2003). Este gene mitocondrial tem sido freqüentemente empregado para esclarecer relações filogenéticas intra e inter específicas entre roedores sigmodontinos (BONVICINO & MOREIRA, 2001; SALAZAR-BRAVO *et al.*, 2001), constituindo uma importante ferramenta na distinção de espécies crípticas. Da mesma forma, também tem auxiliado na delimitação de unidades evolutivas na natureza, uma vez que caracteres morfológicos e citogenéticos nem sempre proporcionam acurácia suficiente.

Análises realizadas por SMITH & PATTON (1999) revelaram *Brucepattersonius* como grupo irmão de *Blarinomys* e *Lenoxus*. Detectaram também a presença de duas espécies, uma formada por indivíduos de São Paulo (Capão Bonito e Boracéia) e um indivíduo do Brejo da Lapa, Itamonte - MG e outra formada apenas por indivíduos do Brejo da Lapa. Estes resultados evidenciaram a ocorrência de espécies simpátricas no gênero. Entretanto, estudos intra-genéricos com um maior número de indivíduos e com maior abrangência da área de distribuição do gênero não foram ainda realizados, o que colabora para a falta de elucidação na definição dos limites de cada espécie, bem como das relações entre as diferentes espécies deste gênero.

As populações das espécies do sudeste estão aparentemente restritas a altitudes elevadas, sendo, portanto, isoladas umas das outras. Este padrão de distribuição levanta questões sobre o grau de isolamento destas populações e das encontradas ao sul de São Paulo, havendo então a necessidade de se verificar se estas populações representariam táxons diferentes.

No presente trabalho os enfoques molecular e morfológico são utilizados de forma complementar no sentido de identificar possíveis unidades evolutivas entre as amostras de *Bucepattersonius* obtidas ao longo da área da ampla distribuição do gênero. Para tanto, a variabilidade genética é analisada para uma grande amostra de uma localidade e comparada entre diversas localidades no sentido de revelar a magnitude da divergência genética em uma escala local e em uma escala mais ampla da distribuição do gênero. As unidades genéticas reveladas nestes níveis são contrastadas com resultados de análises morfométricas obtidas nas mesmas escalas e as congruências entre as duas abordagens são utilizadas para definir unidades evolutivas no gênero.

Os objetivos principais deste trabalho são:

- (1) identificar unidades evolutivas independentes no gênero *Bucepattersonius* através das análises de seqüências de ADN do gene mitocondrial citocromo b (cit-b);
- (2) relacionar unidades e padrões morfométricos através de análises estatísticas exploratórias efetuadas sobre matrizes de medidas cranianas.
- (3) sugerir uma hipótese de relacionamento filogenético entre as espécies analisadas do gênero.

2 – Material e Métodos

2.1. Material utilizado:

Foi utilizado neste estudo o material de *Brucepattersonius* disponível nas seguintes instituições:

Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ (MN);

Museu de Zoologia da USP, São Paulo, SP (MZUSP);

Coleção de Mamíferos da Universidade de Brasília, Brasília, DF (UnB);

Coleção de Zoologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC (UFSC);

Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina (MACN);

Além do material já depositado nestes acervos foi também utilizado o material referido abaixo pelas siglas dos coletores ou localidades, a ser tombado no Museu Nacional (RJ), Museu de Zoologia (SP), Universidade Federal de Minas Gerais (MG) ou no Laboratório de Ecologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo (RS): Cibele Rodrigues Bonvicino (CRB), João A. de Oliveira (JAO), Gabriela Paise (GP), Luiz Flamarion B. de Oliveira (LF), Liliani Marília Tiepolo (LMT), Pablo Rodrigues Gonçalves (PRG), Lena Geise (LG, VA), Valéria Penna-Firme (VPF), Philip Hershkovitz (PH); Renata Pardini (BS, DM), Laura Naxara (L). Também foram utilizadas duas seqüências cedidas por J.L.Patton de espécimes depositados na University of California, Berkeley, EUA, coletados por Meika A. Mustrangi (MAM).

Na lista abaixo, os espécimes utilizados apenas nas análises moleculares estão sublinhados e os utilizados nas análises moleculares e morfológicas estão marcados com um

asterisco. Os números em negrito e entre parênteses referem-se aos pontos interpolados no mapa da figura 2.

BRASIL: MINAS GERAIS:

Município Alto Caparaó: (1) Parque Nacional do Caparaó (20°22'S 41°48'W) (inclui localidades Pico da Bandeira, Segredo e Terreirão): machos MN 32236 (=PH 10186); fêmeas PH 10184, PRG 1117*, 1192; não sexados MN 32017 (=PH 10246) (holótipo de *B. albinasus*) 32018.

Obs.: Localidade tipo das espécies: *B. griserufescens* e *B. albinaus*.

Município de Itamonte: (2) Hotel Alsene, Parque Nacional do Itatiaia (22°21'S 44°42'W): não sexados LG 203*, 204*. (3) Brejo da Lapa (22°21'S 44°44'W): machos MN 47457 (= CRB 1301)*, 47460 (= CRB 1310)*, 60593 (= CRB 1312)*, 60606 (= CRB 1334)*, 60601, 60602 (= CRB 1337)*, 60603 (= CRB 1338)*, 47465 (= CRB 1356)*, 47466 (= CRB 1357)*, 60589, 48016 (= LG 123), 48018 (= LG 108)*, JAO 236, VPF 82; fêmeas MN 47456 (= CRB 1300)*, 47458, 47459, 47461 (= CRB 1340)*, 47462 (= CRB 1353)*, 47463 (= CRB 1354)*, 47464, 48019 (= LG 111)*, 60605 (= CRB 1344)*, 60590 (= CRB 1291)*, 60591 (= CRB 1292)*, 60592 (= CRB 1299)*, 60598, 60599, 60600 (= CRB 1331)*, JAO 234; VPF 86; não sexados MN 60594, 60595, 60596, 60597, 60607; CRB 1319, LF 2168, 2181.

Município de Passa Quatro: (4) Fazenda do Itaguaré, 16 km SW (22°23'S 44°58'W): não sexado MF 12 (seqüência cedida por J. Patton).

RIO DE JANEIRO

Município de Teresópolis: (5) Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22°22'S 42°45'W): macho UnB 722; fêmea UnB: 703. (6) Vale das Antas, Parque Nacional da Serra dos Órgãos

(22°26'S 42°59'W): machos VA 29, 44, 48*, 112*, 116*, 120*, 133*; fêmeas VA 41, 104*, 117*, 125*, 129*; não sexados: VA 7, 126.

Município de Nova Friburgo (7) Pirineus, Macaé de Cima (22°26'S 42°31'W): fêmea VPF 298*.

SÃO PAULO

Município de Bananal: (8) Reserva Ecológica Bananal (23°47'S 46°18'W): não sexados EEB 568, 664, 697, 698.

Município de Biritiba: (9) Estação Biológica de Boracéia, 28 Km SE 3 Km E Biritiba-Mirim (23°39'S 45°54'W): não sexado MVZ 183036 (= MAM 383) (seqüência cedida por J. Patton; nº de acesso no GenBank AY277486, depositado como *B. soricinus*).

Município de Capão Bonito: (10) Fazenda Intervalles, Base do Carmo, 5.5km S Capão Bonito (24°15'S 48°10'W): não sexado MVZ 183250 (= MAM 342) (seqüência cedida por J. Patton; nº de acesso no GenBank AF108667, depositado como *Oxymycterus iheringi* (= *B. iheringi*)).

Município de Casa Grande: (11) Casa Grande (24°19'S 47°38'W): macho MZUSP 21129.

Município de Cotia: (12) Caucaia do Alto (23°41'S 47°01'W): machos L 68, 104; fêmeas L 84, 94; não sexados L 59, 73, 81. (13) Reserva Morro Grande (23°39'S 46°47'W): fêmeas PRG 1324, 1343.

Município de Onça Parda: (14) Onça Parda (24°19'S 47°51'W): macho MZUSP 10611.

Município de Santo André: (15) Serra de Paranapiacaba (23°46'S 46°18'W): não sexados BS 31, 72, 75, 108, 197, 236, 264, 265, 278, 285, 304, 485, 529, 586, 621, 638, 643, 716, 726, 737, 758, 764, 802, 825, 826, 949, 1014, 1148, 1149, 1472, um indivíduo sem número, DM 3, 16, 36.

Município de São Bernardo do Campo: (16) Rio Grande (23°38'S 46°25'W): não sexado MZUSP 30630.

PARANÁ

Município de Ortigueira: (17) Ortigueira (24°12'S 50°57'W): machos MZUSP 31623, 31703; fêmeas MZUSP 31637, 31647, 31704; não sexado MZUSP 31635.

Município de Telêmaco Borba: (18) Telêmaco Borba (24°06'S 50°31'): macho JAO 1695; fêmeas JAO 1693, 1694.

Município de Piraquara: (19) Mananciais da Serra (25°29'S 48°58'W): macho JAO 967.

SANTA CATARINA

Município de Caldas da Imperatriz: (20) Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (27°50' S 48°47'W): machos UFSC-Zool. 705, 707, 725, 726; fêmea UFSC-Zool. 708.

Município de Urubici: (21) Parque Nacional de São Joaquim (28°08'S 49°28'W): machos LMT 343, 391*, 399*; fêmea LMT 394.

RIO GRANDE DO SUL:

Município de Aratiba: (22) margem direita do Rio Uruguai (27°24' S 52°19' W): fêmeas MN 62124 (=CRB 1913)*, 62166, CRB 1944*.

Município de Cambará do Sul: (23) Mata da Pedra do Segredo, Parque Nacional da Serra Geral (29°04' S 49°59'W): fêmea LMT 281. (24) Arroio Preá, Parque Nacional de Aparados da Serra (29°10'S 50°06'W): fêmea LMT 312.

Município de Maquiné: (25) Maquiné (29°32'S 50°15'W): não sexado GP 310.

Município de Osório: (26) Morro Osório (29°54'S 50°16'W): fêmea MN 49798.

Município de Saporanga: (27) Alto Ferrabraz, Morro Ferrabraz (28°54'S 49°33'W): macho MN 49804; fêmeas MN 49800, 49801.

Município de Torres: **(28)** Faxinal Norte, Lagoa Itapeva (29°30'S 49°55'W): fêmeas MN 49805, 49806; não sexados: MN 49799, 49802, 49803.

ARGENTINA

MISIONES

Departamento General Belgrano: **(29)** Urugua-í – Iguazú (25°59'S 54°05'W): machos MACN 18951(Urugua-í), 22247, 22248, 22249, 22250, 22251, 22252; **(30)** Sierra de la Victoria (25°55'S 54°00'W): machos MACN 18950, 18952, 18953.

Departamento Guaraní **(31)** Dos de Mayo (27°02'S 54°19'W): fêmea MACN 17670.

Durante a realização deste trabalho foram feitas expedições para obtenção de espécimes nas seguintes localidades: Mananciais da Serra, município Piraquara (PR) de 2 a 7 de setembro de 2002, Parque Nacional (PARNA) do Caparaó (MG e ES) de 22 de agosto a 03 de setembro de 2003, PARNA Aparados da Serra (RS) de 15 a 25 de março de 2004, PARNA Serra Geral (RS) de 15 a 25 de Março de 2004 PARNA São Joaquim (SC) de 28 de março a 03 de maio de 2004. Os espécimes coletados estão incluídos na relação acima.

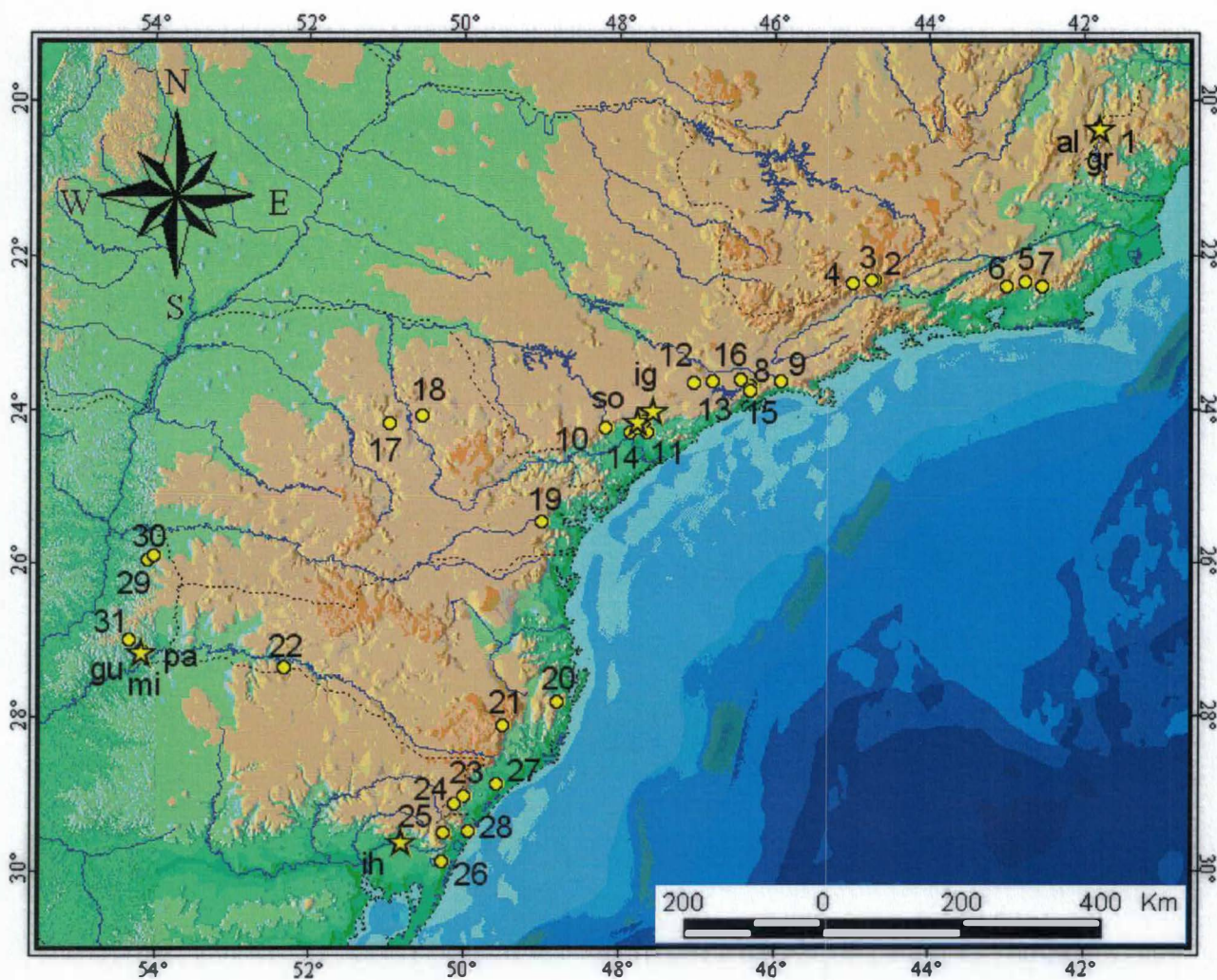


Figura 2. Localidades, referidas pela numeração destacada em negrito acima, das amostras de *Bucepattersonius* utilizadas neste estudo. Estrelas indicam localidades-tipo: Bs = *B. soricinus* (Ribeirão Fundo, São Paulo, Brasil); ih = *B. iheringi* (Rio dos Sinos, Taquara do Mundo Novo, Rio Grande do Sul, Brasil); ig = *B. igniventris* (Parque Estadual Petar, Iporanga, São Paulo, Brasil); gr = *B. grisenufescens* (Terreirão, Parque Nacional do Caparaó, Minas Gerais, Brasil); al = *B. albinasus* (Pico da Bandeira, Parque Nacional do Caparaó, Minas Gerais, Brasil); pa = *B. paradisus* (“Entroncamento entre rodovia 2 e Arroyo Paraíso”, Departamento Guaraní, Província de Misiones, Argentina); mi = *B. misionensis* (“Entroncamento entre a rodovia 21 e Arroyo Oveja Negra”, aprox. 2 Km W Parque Provincial Moconá, Departamento Guaraní, Província de Misiones, Argentina); gu = *B. guarani* (“6 Km NE pela rodovia 2 a partir do entroncamento entre rodovia 2 e Arroyo Paraíso”, Departamento Guaraní, Província de Misiones, Argentina).

2.2. Análises morfométricas

2.2.1. Medidas cranianas

Medidas cranianas foram tomadas utilizando-se um paquímetro digital Mitutoyo (0.01-150mm – modelo 500-144B) sob microscópio estereoscópico. Foram tomadas 19 medidas cranianas, a maior parte das quais já definidas na literatura (HERSHKOVITZ, 1998; OLIVEIRA, 1998; Fig. 3): **CMC** - comprimento máximo do crânio, **CN** - comprimento do nasal, **LR** - largura do rosto, **LZ** - largura do zigomático, **LI** - largura interorbital, **LCC** - largura da caixa craniana, **CFP** - comprimento fronto-parietal, **CPP** - comprimento da ponte palatina, **CFI** - comprimento do forame incisivo, **PN** - comprimento da projeção nasal, **CD** - comprimento do diastema, **CSMS** - comprimento da série molar superior, **AMC** - altura mediana do crânio, **LPZ** - largura da placa zigomática, **ACC** - altura da caixa craniana, **CMM** - comprimento máximo da mandíbula, **CSMI** - comprimento da série molar inferior. Além destas as seguintes medidas foram definidas no presente estudo: **CBO** - comprimento do basio-occipital do occipital e **AMM** - altura mediana da mandíbula.

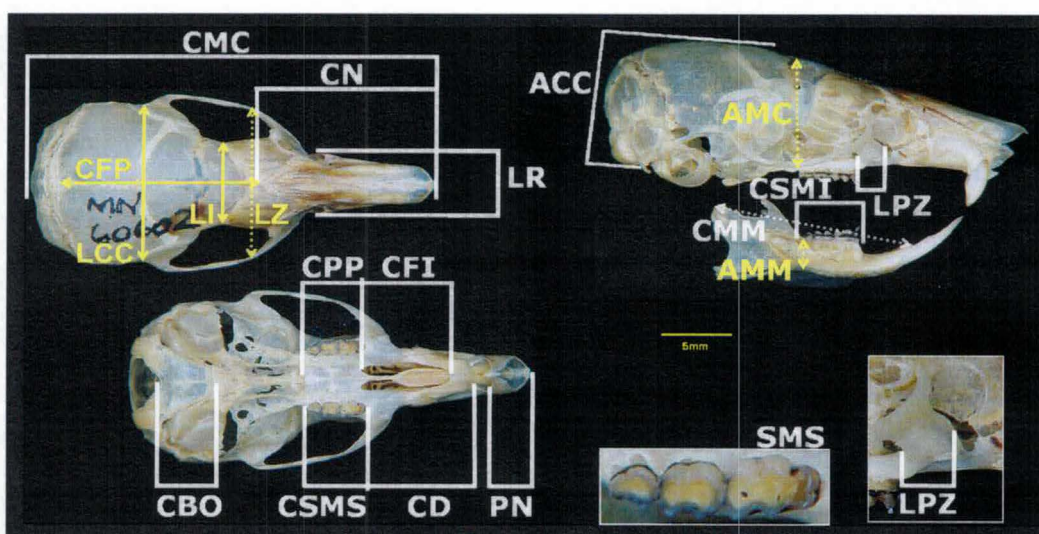


Figura 3. Dezenove medidas cranianas aferidas neste estudo. Barra da escala = 5mm. As medidas e respectivas siglas estão descritas no texto. Em detalhe: SMS - série molar superior e LPZ - largura da placa zigomática.

2.2.2. Estimativa dos dados ausentes

Nas análises morfológicas foram considerados apenas os crânios onde puderam ser aferidas no mínimo 12 das 19 medidas. Neste caso, as medidas que não puderam ser tomadas foram estimadas através de uma rotina de verossimilhança máxima de expectativa-maximização (DEMPSTER *et al.*, 1977). Este procedimento estima e insere dados ausentes iterativamente de forma a manter estável a matriz de variância-covariância. Para 119 indivíduos foi possível obter todas as medidas, e na maioria dos crânios incompletos no máximo quatro medidas não haviam sido tomadas (Tab. 1). Foram estimados 117 valores, correspondendo a 3,9% do total da matriz sendo que apenas um indivíduo apresentou sete dados ausentes (Tab. 1).

Tabela 1. Frequências de medidas ausentes no total de indivíduos utilizados nas análises morfométricas.

Número de medidas ausentes	Número de indivíduos
0	119
1	10
2	3
3	13
4	5
5	7
6	0
7	1
Total	158

2.2.3. Separação de amostras com base no número amostral

A unidade amostral utilizada neste trabalho foi a localidade de coleta. Cada amostra foi classificada com base no número amostral, considerando-se amostras “grandes” aquelas com quatro ou mais indivíduos, e “pequenas” as que apresentaram quatro indivíduos ou

menos (Tabs. 2 e 3).As amostras incluíram apenas exemplares adultos, excluindo-se aqueles que não apresentaram o terceiro molar completamente eclodido. O dimorfismo sexual secundário em medidas cranianas não foi investigado dado o pequeno tamanho das amostras para as quais a determinação do sexo estava disponível.

Tabela 2. Localidades de proveniência das amostras “grandes” ($n \geq 4$), tamanho amostral e sexo dos indivíduos utilizados nas análises morfométricas. n.s.=não sexado(s).

Localidade	Tamanho amostral e sexo
Vale das Antas, RJ	13 (6 ♂, 5 ♀, 2 n.s.)
Brejo da Lapa, MG	38 (13 ♂, 18 ♀, 7 n.s.)
Caucaia do Alto, SP	7 (2 ♂, 2 ♀, 3 n.s.)
Paranapiacaba, SP	34 (n.s.)
Bananal, SP	4 (n.s.)
Ortigueira, PR	6 (2 ♂, 3 ♀, 1 n.s.)
Urubici, SC	4 (3 ♂, 1 ♀)
Caldas da Imperatriz, SC	5 (4 ♂, 1 ♀)
Torres, RS	5 (2 ♀, 3 n.s.)
Aratiba, RS	8 (7 ♀, 1 n.s.)
Urugua-í-Iguazú, ARG	7 (♂)

Tabela 3: Localidades de proveniência das amostras “pequenas” ($n < 4$), tamanho amostral e sexo dos indivíduos. n.s.=não sexado(s).

Localidade	Tamanho amostral e sexo
Alto Caparaó, MG	2 (♀)
Nova Friburgo, RJ	1 (♀)
Teresópolis, RJ	2 (1 ♂, 1 ♀)
Itamonte, MG	2 (♀)
Casa Grande, SP	1 (♂)
Cotia, SP	2 (♀)
Onça Parda, SP	1 (♂)
São Bernardo, SP	1 (n.s.)
Telêmaco Borba, PR	3 (1 ♂, 2 ♀)
Piraquara, PR	1 (♂)
Sapiranga, RS	3 (1 ♂, 2 ♀)
Osório, RS	1 (♀)
Maquiné, RS	1 (n.s.)
Aparados da Serra, RS	1 (♀)
Serra Geral, RS	1 (♀)
Dpto. Dos de Mayo, AR	1 (♀)
Serra de la Victória, AR	3 (♂)

2.2.4. Análises multivariadas

No sentido de analisar a variabilidade morfométrica nas amostras das diferentes localidades foram empregados métodos multivariados, a saber, a Análise dos Componentes Principais e a Análise de Variáveis Canônicas.

2.2.4.1. Análise de componentes principais

Os valores da matriz original de 19 caracteres medidos em 158 indivíduos foram transformados para logaritmo, e foi obtida a matriz de variância-covariância. Dessa matriz foram extraídos autovetores e autovalores em uma análise de componentes principais (JOLICOEUR & MOSIMANN, 1960).

Este procedimento teve como objetivo explorar os padrões gerais de variação no tamanho e forma entre todos os indivíduos, tratados inicialmente como pertencentes a uma única população, mas posteriormente identificados segundo a localidade de proveniência nos gráficos definidos pelos componentes principais.

2.2.4.2. Análise de variáveis canônicas

A análise de variáveis canônicas foi utilizada com o intuito de se verificar a variação morfológica craniana entre os grupos definidos *a priori*, com base nas localidades de coleta. Nesta análise foram utilizadas apenas as amostras “grandes”. Nesta análise são extraídas variáveis canônicas, que correspondem aos autovetores de uma matriz onde está extremada a variabilidade entre-grupos com relação a variabilidade intra-grupal. As variáveis canônicas definem o espaço multivariado onde são interpolados os escores individuais, rotulados segundo as localidades de proveniência, que neste caso constituíram os grupos definidos conforme a tabela 2.

2.2.4.3. Distâncias multivariadas entre amostras

A distância multivariada entre as amostras foi estimada considerando-se, além da distância acumulada entre as médias de todos os caracteres, a covariância entre eles, consistindo em uma estimativa multivariada ou multidirecional da separação entre os centróides de cada grupo. A distância de Mahalanobis (D_2) é a estimativa que melhor se ajusta nesta abordagem, constituindo a base para as quantificações das separações entre os grupos (MANLY, 1994).

2.2.4.4. Análise de agrupamento das amostras “grandes”

Para a construção de dendrogramas de agrupamento das amostras “grandes” foi utilizado o método UPGMA (*Unweighted Pair Group using Mathematic Averages*) baseado nas distâncias de Mahalanobis entre amostras “grandes”.

2.2.4.5. Classificação *a posteriori* de amostras “pequenas”

As amostras “pequenas” foram associadas às amostras “grandes” com base nas frequências das menores distâncias de Mahalanobis estimadas em 1000 interações de *bootstrap*.

Para todas as análises multivariadas foi utilizado o programa MATLAB 4 (MATHWORKS, 1992) utilizando rotinas escritas por R.E. Strauss, disponíveis no seguinte endereço eletrônico: <http://www.biol.ttu.edu/Strauss/Matlab/matlab.htm>.

2.3. Análise Citogenética

A obtenção de células em suspensão da maior parte dos indivíduos se deu através da técnica de cultura de medula óssea em meio de cultura RPMI 1640 (80%) e soro bovino fetal (20%) por duas horas com adição de colchicina (10^{-6} M) e 0,1 ml de brometo de etídeo $5\mu\text{g/mL}$; choque hipotônico com KCl (0,075M) por 30 minutos; e fixação com Carnoy (metanol – ácido acético 3:1). Este processo foi realizado durante as expedições científicas e está detalhado no ANEXO I.

Após a preparação das lâminas as imagens das metáfases foram obtidas via microscópio óptico com posterior revelação e amplificação dos filmes fotográficos. A ampliação dos filmes foi feita nos laboratórios de Genética e de Mastozoologia ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os cariótipos foram montados seguindo uma ordem crescente de tamanho dos autossomos e os cromossomos sexuais foram colocados à parte.

2.4. Análises moleculares

2.4.1. Obtenção das seqüências de ADN

As amostras de tecido hepático se encontravam fixadas em etanol absoluto e armazenadas a 4°C . O ADN foi extraído através do kit para extração de ADN da Amersham Biosciences, com modificações, ou pelo método de extração fenol - clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989), também com modificações (ANEXO II). A concentração e qualidade do ADN extraído em ambas as técnicas foram verificadas em gel de agarose à 0,8% com brometo de etídio ($10,0\text{ mg/mL}$) através da técnica de eletroforese, sendo as bandas confirmadas em transiluminador UV.

O gene completo do citocromo *b* (1140pb) foi amplificado através de reação de polimerase em cadeia (*Polymerase chain reaction* - PCR) utilizando-se para uma reação de volume total de $50\text{ }\mu\text{L}$: ADN (de $250,0\text{ ng}$ a $1,0\text{ }\mu\text{g}$), dNTPs ($25,0\text{ mM/mL}$), MgCl_2 ($6,5\text{ mM}$),

tampão 10X (Promega®, diluído 10 vezes) e a combinação de iniciadores (1,0 pmol) MVZ05 e MVZ14 (Fig. 4, Tab. 4). A reação de amplificação foi executada em 35 ciclos, com desnaturação a 92°C por 2 minutos, anelamento por 1,5 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, a temperatura de anelamento variou entre 44° e 50°C.

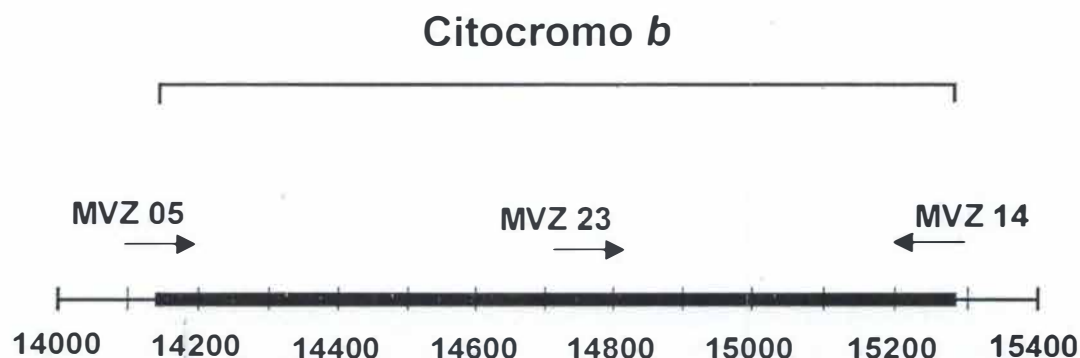


Figura 4. Localização dos iniciadores utilizados neste trabalho dentro da seqüência do gene citocromo *b* de *Mus musculus*. Modificado de SMITH & PATTON (1993).

Os produtos amplificados obtidos foram checados em eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1,5% contendo brometo de etídio (10,0 mg/ml) e observados em um transiluminador UV, sendo o tamanho do fragmento estimado baseando-se em um marcador de tamanho de fragmento de 100 pares de base aplicado no gel com as amostras (Invitrogen ou Promega). Os produtos amplificados foram purificados através do kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” da Amersham Biosciences sendo a presença ou não do fragmento desejado verificada novamente em gel de agarose a uma concentração de 1,5% contendo brometo de etídio (10,0 mg/mL) e observados em um transiluminador UV.

Alguns destes géis foram fotografados através de um transiluminador munido de aparato fotográfico acoplado a um computador, sendo a imagem capturada e ajustada através

do programa “Eagle Eye” e impressas ou armazenadas em disquete de 3,5” para posterior impressão.

Tabela 4. Seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação e seqüenciamento dos 1140 pb do gene mitocondrial citocromo *b*.

Iniciadores	Seqüência (5’ a 3’)
Cadeia Leve	
MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
MVZ23	TACTCTTCCTCCACGAAACIGGITC
Cadeia Pesada	
MVZ14	GGTCTTCATCYHGGYTTACAAGAC

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciadores automáticos MegaBACE 1000 ou ABI Prism 377 (ambos da Amersham Biosciences), utilizando-se os iniciadores MVZ05, MVZ23 e MVZ14 (Tab. 4). A reação de seqüenciamento consistiu de 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Para o seqüenciamento foi utilizado 3,2µL de iniciador, 4,8µL do produto amplificado (podendo variar de acordo com a concentração), e 2,0µL de tampão de seqüenciamento, um kit diferente para cada seqüenciador. “DYEnamic™ ET dye terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no MegaBACE e “DYEnamic™ ET dye terminator Cycle Sequencing Kit” no ABI Prism 377. As seqüências foram alinhadas manualmente e editadas através do programa Sequence Navigator 3.3 (APPLIED BIOSYSTEMS, Inc., 1994).

2.4.2. Análises filogenéticas

Para as estimativas de distância genética, análises de parcimônia máxima e verossimilhança máxima foram utilizados 914 pares de base (da base 14 à base 927) de cada indivíduo. Como grupo externo foram utilizadas seqüências obtidas no GenBank dos seguintes roedores: *Scotinomys xerampelinus* (Nº de acesso AF108706) e *Neotoma albigula* (Nº de acesso AF108704) da subfamília Neotominae, e *Blarinomys breviceps* (Nº de acesso AF108668) e *Lenoxus apicalis* (Nº de acesso U03541) da subfamília Sigmodontinae, tribo Akodontini.

Para as estimativas de distância genética foi utilizado o modelo de distância p, em comparações par-a-par, considerando-se transições e transversões em todos os sítios, inclusive os não codificantes, e deleção para a par, no caso de ausência de dados. Para obtenção da árvore de distância foi utilizado o procedimento de agrupamentos vizinhos, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Para estas análises foi utilizado o programa Mega 2.1 (KUMAR *et al.*, 2000)

A construção das árvores de parcimônia máxima foi realizada através de busca heurística com a implementação do algoritmo *tree bisection-reconnection (TBR)* e adições passo-a-passo de ramos com 10 replicações ao acaso com a razão transição: transversão de 1:1 e 4:1.com o programa Paup* 4.0b10 (SWOFFORD, 1993). A estimativa da razão de transições e transversões foi calculada no programa MEGA 2.1 nas formas direcional e não direcional, e mostrou a razão de 4 transições para 1 transversão. A robustez dos nós foi verificada com a implementação da técnica de reamostragem de *bootstrap* com 160 réplicas. Uma segunda análise de parcimônia máxima com um número reduzido de táxons foi realizada com um número maior de réplicas de *bootstrap* para reamostragem (1000). Nessa análise os

outros passos foram mantidos como explicados acima, e foram utilizados 14 espécimes de *Brucepattersonius*, e *Lenoxus apicalis* e *Blarinomys breviceps* como grupo externo.

A construção da árvore de verossimilhança máxima foi realizada com a implementação do algoritmo *tree bisection-reconnection* (TBR) com a adição aleatória de ramos, passo-a-passo com base em 10 réplicas. O modelo evolutivo de substituições de base utilizado foi o de GTR+I+G (SWOFFORD *et al.*, 1996) com frequências variáveis para cada nucleotídeo (A=0,30, C=0,31, G=0,13 e T=0,26), acrescido do percentual de sítios invariáveis (P inv = 0,5045) e correção gama da distribuição (alfa = 3,1722). A escolha deste modelo foi realizada submetendo-se a matriz de dados à rotina MODELTEST 3.06, usado para testar quais diferentes modelos de evolução se adequam às seqüências em questão (Posada e CRANDALL, 1998). Esta análise foi realizada com o programa PAUP*4.0 e o modelo GTR+I+G foi escolhido por apresentar -Ln l=4207,31, o menor valor entre todos os modelos.

2.4.3. Análises de variação morfológica e molecular dentro de linhagens

Para investigar a variação morfológica e molecular intraespecífica e a estruturação geográfica em um nível mais refinado, foi selecionada uma amostra com grande número de haplótipos que se revelaram como pertencentes a uma linhagem monofilética nas análises moleculares de verossimilhança máxima, parcimônia máxima e de agrupamentos vizinhos. Para avaliar a variação morfológica nesta linhagem foram realizadas análises multivariadas, detalhadas no item 2.2.4. A variação genética foi analisada utilizando-se o método de *median-joining* com o programa Network 4.1.0.8, disponível no endereço eletrônico: <http://www.fluxus-engineering.com>. Este tipo de reconstrução filogenética combina características do algoritmo de KRUSKAL (1956) para encontrar árvores de *minimum spanning* pelo favorecimento de ligações curtas, com o algoritmo heurístico de parcimônia

máxima de FARRIS (1970). Esta análise utiliza apenas sítios variáveis (BANDELT *et al.*, 1999), e é uma das que melhor se ajusta no caso de estudos intra-específicos (POSADA & CRANDALL, 2001).

Os sítios variáveis foram selecionados dentro dos mesmos 914 pares de base utilizados nas análises filogenéticas. Sítios com dados ausentes não foram considerados nesta análise e por isso a diminuição do número de sítios variáveis não está somente relacionada à similaridade entre os haplótipos. Ambas análises foram utilizadas no sentido de se verificar a estruturação geográfica dentro das linhagens.

3 – Resultados

3.1. Análises morfométricas

3.1.1. Estatística descritiva da variabilidade craniana entre populações

Os indivíduos do Vale das Antas, RJ, Brejo da Lapa, MG, Aratiba, RS e Uruguaí-Iguazú, Argentina apresentaram em geral as maiores médias relacionadas ao comprimento craniano, sendo o comprimento máximo do crânio (CMC) a medida com as maiores médias compartilhadas entre os indivíduos das quatro localidades (Tab. 5). Os indivíduos do Vale das Antas e Brejo da Lapa apresentaram as maiores médias para o comprimento do nasal (CN), comprimento fronto-parietal (CFP), comprimento do forame incisivo (CFI) e comprimento do diastema (CD). Os indivíduos de Aratiba e Uruguaí-Iguazú apresentaram as maiores médias para as medidas do comprimento da ponte palatina (CPP), comprimento do basio-occipital do occipital (CBO) e comprimento máximo da mandíbula (CMM). Os indivíduos de três destas localidades também apresentaram em geral maior largura do crânio, o que pode ser notado nos valores elevados da largura interorbital (LI) para os do Vale das Antas e do Brejo da Lapa, e das larguras da caixa craniana (LCC), do zigomático (LZ) e do rosto (LR) para os indivíduos de Aratiba.

O crânio mais alto foi detectado nos indivíduos de Brejo da Lapa e Vale das Antas, com maiores valores médios para altura mediana do crânio (AMC), assim como nos indivíduos de Torres, que apresentaram também valores médios elevados para a altura da caixa craniana (ACC). A outra medida relacionada à altura, a altura mediana da mandíbula (AMM), foi maior nos indivíduos de Uruguaí-Iguazú, porém neste caso talvez ela esteja mais associada com a robustez craniana (Tab. 5).

Tabela 5. Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo (entre parênteses), e número de indivíduos medidos para cada variável em cada uma das amostras “grandes” .

	Brejo da Lapa	Vale das Antas	Caucaia do Alto	Parana-piacaba	Bananal	Ortigueira	Urubici	Caldas da Imperatriz	Torres	Aratiba	Urugua-í Iguazú
	MG	RJ	SP	SP	SP	PR	SC	SC	RS	RS	AR
CMC	29,06 ± 0,64 (27,62-30,42) 36	28,98 ± 0,55 (27,57-29,68) 11	26,91 ± 0,95 (25,24-27,57) 5	27,29 ± 1,01 (25,46-29,19) 23	27,51 ± 0,47 (27,18-28,19) 4	26,74 ± 0,64 (25,97-27,68) 6	28,15 ± 1,16 (27,13-29,60) 4	28,85 ± 0,65 (28,22-29,94) 5	28,35 ± 0,25 (28,14-28,77) 5	28,82 ± 0,55 (27,94-29,71) 8	29,45 1
CN	12,21 ± 0,56 (11,13-13,69) 36	12,26 ± 0,36 (11,86-13,03) 11	11,20 ± 0,74 (10,22-12,18) 5	11,47 ± 0,78 (10,53-14,45) 23	11,52 ± 0,52 (10,96-12,05) 4	11,14 ± 0,52 (10,28-11,67) 6	12,01 ± 0,89 (11,39-13,31) 4	12,03 ± 0,66 (11,34-13,12) 5	11,90 ± 0,19 (11,75-12,12) 5	12,02 ± 0,57 (11,19-12,62) 8	12,27 ± 0,37 (11,83-12,85) 7
LR	4,19 ± 0,34 (3,19-4,67) 36	4,43 ± 0,18 (4,09-4,70) 13	4,08 ± 0,31 (3,44-4,45) 7	4,37 ± 0,29 (3,49-4,97) 34	4,03 ± 0,34 (3,67-4,35) 4	4,06 ± 0,29 (3,79-4,47) 6	3,91 ± 0,13 (3,72-4,02) 4	4,58 ± 0,13 (4,41-4,76) 5	4,39 ± 0,20 (4,07-4,63) 5	4,63 ± 0,11 (4,51-4,81) 8	4,54 ± 0,14 (4,40-4,81) 7
LZ	10,45 ± 0,56 (9,46-11,89) 38	10,68 ± 0,28 (10,31-11,26) 11	10,53 ± 0,64 (9,81-11,60) 7	10,79 ± 0,54 (9,87-11,80) 27	9,94 ± 0,49 (9,53-10,64) 4	10,19 ± 0,61 (9,63-11,25) 6	9,88 ± 0,40 (9,44-10,35) 4	10,91 ± 0,54 (10,41-11,63) 5	9,97 ± 0,44 (9,53-10,46) 5	11,45 ± 0,43 (10,84-11,85) 6	11,34 ± 0,50 (10,39-11,96) 7
LI	6,31 ± 0,20 (5,87-6,70) 38	6,38 ± 0,18 (6,09-6,63) 13	5,68 ± 0,13 (5,44-5,87) 7	5,80 ± 0,26 (5,38-6,83) 34	5,83 ± 0,07 (5,77-5,93) 4	5,62 ± 0,15 (5,48-5,87) 6	5,55 ± 0,16 (5,44-5,78) 4	6,02 ± 0,18 (5,80-6,19) 5	5,97 ± 0,10 (5,80-6,06) 5	5,93 ± 0,15 (5,72-6,18) 8	5,75 ± 0,18 (5,55-6,05) 7
LCC	12,39 ± 0,30 (11,87-13,20) 38	12,37 ± 0,33 (11,77-13,01) 13	12,06 ± 0,36 (11,65-12,58) 6	12,03 ± 0,31 (11,40-12,73) 34	11,93 ± 0,29 (11,74-12,36) 4	11,56 ± 0,28 (11,20-11,80) 6	11,64 ± 0,23 (11,38-11,94) 4	12,45 ± 0,39 (11,88-12,97) 5	12,25 ± 0,22 (11,86-12,41) 5	12,46 ± 0,41 (11,86-12,97) 8	12,69 1
CFP	14,99 ± 0,44 (14,00-15,81) 38	14,57 ± 0,41 (13,69-14,96) 13	14,34 ± 0,43 (13,69-14,80) 7	13,98 ± 0,59 (12,96-14,99) 34	14,19 ± 0,69 (13,49-14,93) 4	13,62 ± 0,36 (13,08-13,96) 6	14,34 ± 0,32 (14,14-14,81) 4	14,37 ± 0,30 (13,96-14,69) 5	13,86 ± 0,40 (13,31-14,42) 5	14,67 ± 0,60 (14,02-15,27) 8	13,79 1
CPP	4,22 ± 0,31 (3,61-5,05) 38	4,31 ± 0,28 (3,80-4,74) 13	3,98 ± 0,28 (3,60-4,27) 7	3,99 ± 0,28 (3,57-4,65) 33	4,11 ± 0,21 (3,83-4,34) 4	3,78 ± 0,24 (3,40-4,13) 6	3,74 ± 0,15 (3,60-3,94) 4	4,27 ± 0,35 (3,91-4,73) 5	4,02 ± 0,31 (3,72-4,42) 5	4,62 ± 0,29 (4,20-5,03) 8	4,43 ± 1,13 (4,24-4,64) 7
CFI	6,07 ± 0,24 (5,58-6,60) 38	5,98 ± 0,31 (5,28-6,32) 13	5,49 ± 0,25 (5,15-5,92) 7	5,51 ± 0,32 (4,68-6,20) 33	5,47 ± 0,13 (5,29-5,60) 4	5,39 ± 0,26 (5,08-5,80) 6	5,59 ± 0,41 (5,23-6,14) 4	5,82 ± 0,14 (5,66-5,97) 5	5,64 ± 0,23 (5,30-5,83) 5	5,32 ± 0,41 (4,62-5,81) 8	5,17 ± 1,39 (4,38-5,60) 7
PN	2,07 ± 0,27 (1,30-2,60) 36	1,70 ± 0,29 (1,17-2,20) 11	1,84 ± 0,40 (1,29-2,33) 5	1,82 ± 0,28 (1,51-2,53) 22	1,72 ± 0,19 (1,50-1,96) 4	2,03 ± 0,34 (1,75-2,60) 6	2,39 ± 0,10 (2,28-2,48) 4	2,18 ± 0,26 (1,88-2,59) 5	1,97 ± 0,18 (1,77-2,22) 5	2,12 ± 0,15 (1,85-2,33) 8	2,25 ± 1,28 (1,89-2,54) 7

Tabela 5 (Continuação). Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo (entre parênteses), e número de indivíduos medidos para cada variável em cada uma das amostras “grandes”.

	Brejo da Lapa	Vale das Antas	Caucaia do Alto	Parana-piacaba	Bananal	Ortigueira	Urubici	Caldas da Imperatriz	Torres	Aratiba	Urugua-í Iguaçu
	MG	RJ	SP	SP	SP	PR	SC	SC	RS	RS	AR
CD	7,44 ± 0,28 (6,98-8,22) 38	7,35 ± 0,23 (6,95-7,68) 13	6,46 ± 0,38 (6,00-7,14) 7	6,56 ± 0,50 (5,57-7,52) 34	6,57 ± 0,32 (6,27-6,86) 4	6,60 ± 0,34 (6,20-7,03) 6	6,89 ± 0,50 (6,42-7,34) 4	7,07 ± 0,28 (6,84-7,54) 5	5,89 ± 0,12 (6,75-7,03) 5	7,00 ± 0,36 (6,39-7,34) 8	7,06 ± 1,19 (6,77-7,29) 7
CSMS	4,23 ± 0,16 (4,01-4,62) 38	4,35 ± 0,09 (4,22-4,57) 13	4,38 ± 0,15 (4,22-4,67) 7	4,33 ± 0,12 (4,04-4,55) 34	4,24 ± 0,08 (4,14-4,33) 4	4,64 ± 0,06 (4,02-4,19) 6	4,13 ± 0,03 (4,10-4,15) 3	4,48 ± 0,05 (4,40-4,55) 5	4,31 ± 0,14 (4,12-4,44) 5	4,39 ± 0,09 (4,22-4,50) 8	4,56 ± 1,19 (4,29-4,90) 7
CBO	3,83 ± 0,28 (2,99-4,44) 38	3,81 ± 0,17 (3,47-4,05) 13	3,65 ± 0,21 (3,36-3,82) 7	3,82 ± 0,23 (3,38-4,41) 34	3,74 ± 0,22 (3,52-3,99) 4	3,57 ± 0,12 (3,46-3,76) 6	3,41 ± 0,26 (3,14-3,76) 4	3,94 ± 0,40 (3,38-4,33) 5	3,79 ± 0,11 (3,72-3,95) 4	3,95 ± 0,12 (3,80-4,15) 7	4,14 1
AMC	8,10 ± 0,26 (7,33-8,67) 38	7,91 ± 0,19 (7,60-8,32) 13	7,51 ± 0,22 (7,05-7,73) 7	7,57 ± 0,28 (3,99-8,12) 34	7,49 ± 0,19 (7,35-7,77) 4	7,39 ± 0,39 (6,95-8,08) 6	7,56 ± 0,28 (7,29-7,91) 4	7,84 ± 0,20 (7,53-8,09) 5	8,10 ± 0,11 (7,93-8,22) 5	7,83 ± 0,21 (7,55-8,20) 8	7,64 ± 0,33 (7,17-8,08) 7
LPZ	1,59 ± 0,12 (1,15-1,81) 38	1,56 ± 0,12 (1,45-1,89) 13	1,47 ± 0,17 (1,19-1,69) 7	1,53 ± 0,25 (1,05-2,07) 34	1,66 ± 0,08 (1,61-1,77) 4	1,47 ± 0,23 (1,09-1,70) 6	1,54 ± 0,15 (1,38-1,70) 4	1,55 ± 0,17 (1,29-1,70) 5	1,65 ± 0,15 (1,43-1,77) 5	1,65 ± 0,09 (1,51-1,80) 8	1,58 ± 0,07 (1,50-1,66) 7
ACC	9,16 ± 0,34 (8,37-10,17) 38	8,91 ± 0,44 (8,21-9,76) 13	8,58 ± 0,25 (8,33-9,04) 7	8,65 ± 0,41 (8,02-9,52) 34	9,41 ± 0,24 (9,14-9,66) 4	8,70 ± 0,33 (8,29-9,26) 6	8,80 ± 0,24 (8,44-8,94) 4	8,91 ± 0,11 (8,75-9,03) 5	9,49 ± 0,38 (9,20-10,01) 5	8,92 ± 0,26 (8,55-9,37) 8	8,91 1
CMM	14,06 ± 0,55 (12,72-15,69) 38	13,87 ± 0,49 (13,06-14,66) 13	13,37 ± 0,53 (12,51-14,09) 7	13,50 ± 0,63 (12,58-14,93) 34	13,37 ± 0,22 (13,14-13,67) 4	13,25 ± 0,54 (12,74-14,12) 6	13,31 ± 0,84 (12,52-14,31) 4	13,85 ± 0,55 (13,02-14,42) 5	13,60 ± 0,30 (3,35-14,06) 5	14,29 ± 0,40 (13,39-14,72) 8	14,15 ± 0,18 (14,01-14,54) 7
AMM	1,97 ± 0,20 (1,53-2,45) 38	2,01 ± 0,24 (1,54-2,54) 13	2,11 ± 0,16 (1,89-2,34) 7	2,11 ± 0,25 (1,22-2,56) 34	2,14 ± 0,05 (2,08-2,19) 4	2,16 ± 0,32 (1,58-2,50) 6	1,78 ± 0,30 (1,57-2,22) 4	2,33 ± 0,13 (2,14-2,48) 5	2,23 ± 0,12 (2,13-2,44) 5	2,23 ± 0,17 (1,97-2,49) 8	2,41 ± 0,06 (2,34-2,48) 7
CSMI	4,51 ± 0,17 (4,19-4,99) 38	4,69 ± 0,11 (4,49-4,88) 13	4,64 ± 0,18 (4,43-4,89) 7	4,70 ± 0,12 (4,32-4,99) 34	4,64 ± 0,09 (4,54-4,72) 4	4,48 ± 0,36 (4,27-4,74) 6	4,32 ± 0,08 (4,24-4,39) 3	4,86 ± 0,23 (4,61-5,09) 5	4,56 ± 0,22 (4,18-4,73) 5	4,54 ± 0,16 (4,35-4,80) 8	4,76 ± 0,05 (4,69-4,86) 7

Em geral, os crânios menores em comprimento foram os dos indivíduos de Ortigueira, por apresentarem o maior número de medidas associadas ao comprimento com médias mais baixas (CMM, CN, CFP, CPP e CMM), apresentando também a menor média em largura da caixa craniana (LCC). Os indivíduos de Urubici, apresentaram três medidas relacionadas ao comprimento com médias mais baixas (CPP, CBO e CMM), porém destaca-se pelo fato de apresentar as menores médias relacionadas à largura craniana (LI, LZ e LR).

Não foi possível verificar um padrão na variação dos comprimentos das séries molares superiores e inferiores (CSMS e CSMI) e da largura da placa zigomática (LPZ), apesar dos indivíduos de Urubici apresentarem os menores valores médios no comprimento das séries molares (CSMS e CSMI).

3.1.2. Análises multivariadas

Na análise de componentes principais, os quatro primeiros componentes foram responsáveis pela explicação de 74,78% da variação entre as amostras (CP1-36,01%, CP2-16,09%, CP3-15,03% e CP4-7,65%) e os cinco primeiros responsáveis por 80,27%. Quando interpolados os escores individuais no espaço multivariado definido pelo primeiro e segundo componentes principais, revelou-se uma ampla superposição. Porém pode-se notar que a amostra de Urubici (8) apresenta escores mais altos no CP2, que determina uma sutil separação desta amostra do restante (Fig. 5) Dos quatro primeiros componentes principais o único que separa estas amostras é o CP2.

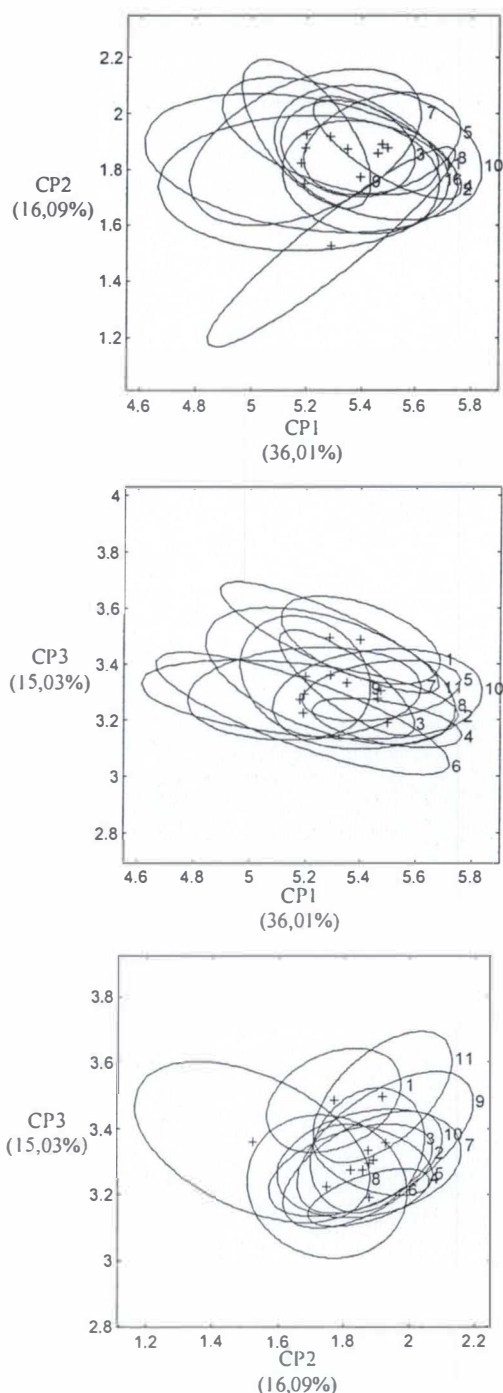


Figura 5. Elipses de 95% de intervalo de confiança dos escores individuais interpolados de cada amostra “grande” no espaço multivariado definido pelos componentes principais (CP). Números nas figuras indicam a área referente aos escores dos indivíduos de cada uma das amostras grandes: 1-Brejo da Lapa, MG; 2-Caucaia do Alto, SP; 3-Torres, RS; 4-Uruguia-í-Iguazú, ARG; 5-Aratiba, RS; 6-Ortigueira, PR; 7-Paranapiacaba, SP; 8-Urubici, SC; 9-Bananal, SP; 10-Caldas da Imperatriz, SC e 11-Vale das Antas, RJ.

Nas análises discriminantes canônicas, onde os grupos são definidos *a priori*, quando relacionadas as variáveis canônicas (VC) 1 e 2 que juntas são responsáveis pela explicação de 79,62% da variação entre grupos (VC1-67,01% e VC2-12,61%) notou-se a formação do seguinte padrão: em relação à VC1 houve a separação clara de 2 grupos, um com os indivíduos do Brejo da Lapa (1) e Vale das Antas (11) e outro com o restante das amostras. Dentro deste segundo grupo pode se distinguir mais três outros grupos em relação à VC2: Urubici (8) posicionada no extremo inferior, Ortigueira (6) que apresenta uma ampla distribuição dos pontos, e o restante das amostras (Fig. 6).

As correlações vetoriais em relação à VC1 mostram que a largura do zigomático (LZ) apresenta uma baixa correlação negativa enquanto a largura interorbital (LI) e comprimento máximo do crânio (CMC) apresentaram fortes correlações positivas na separação dos grupos do Brejo da Lapa (1) + Vale das Antas (11) do restante das amostras. A altura mediana do crânio (AMC) e o comprimento do diástema (CD) com uma baixa correlação positiva em relação à VC1 e negativas em relação à VC2, e o comprimento da série molar inferior (CSMI) e largura do rosto (LR) com baixas correlações negativas em relação à VC1 e positivas em relação à VC2, foram responsáveis pela separação do grupo de Urubici (8). Já a largura da caixa craniana (LCC) e largura interorbital (LI) tiveram correlações positivas mais fortes na separação do grupo de Ortigueira (6) ao longo de VC1 e VC2 (Fig. 6 a, b). Quando interpolados no espaço multivariado definido pelas variáveis canônicas 1 e 3, pode se notar um padrão semelhante ao referido acima em relação à VC1, porém em relação à VC3 um grupo formado por indivíduos de Urugua-í-Iguazú (4) encontra-se mais destacado dos demais, porém havendo sobreposição com indivíduos de Aratiba (5) e Paranapicaba (7). O vetor mais correlacionado à VC3 também é o do comprimento máximo do crânio (CMC) com uma forte correlação positiva para ambas as variáveis (Fig. 6 c, d). Quando VC3 é interpolado juntamente à VC2 pode se notar a

separação da amostra de Urubici (8) em relação à amostra de Ortigueira (6) ao longo da VC3, e estas duas das demais ao longo de VC2 com uma correlação vetorial positiva associada à largura da caixa craniana (LCC) e uma correlação negativa associada à altura mediana do crânio (AMC). A VC3 ainda é responsável pela separação da amostra de Urugua-í-Iguazú (4) das demais amostras, porém com uma sobreposição de escores individuais da amostra de Aratiba (5), associada a uma forte correlação positiva ao comprimento máximo do crânio (CMC) (Fig. 6 e,f).

Das 17 amostras consideradas “pequenas” apenas uma (Sapiranga, RS) teve alocação probabilística inequívoca (100%) a uma amostra “grande”, neste caso Torres, RS. Outras seis amostras tiveram alocação acima dos 97 % com destaque para a amostra de Teresópolis, RJ, que se alocou com 98,30% de probabilidade com a amostra do Brejo da Lapa, MG, apresentando apenas 1,40% de alocação à amostra do mesmo complexo montanhoso (Serra dos Órgãos). Outro fato importante consiste na alocação dos indivíduos de Alto Caparaó estarem associados tanto a amostra do Vale das Antas quanto ao Brejo da Lapa. Amostras “pequenas” provenientes da Argentina (Dos de Mayo e Serra de la Victoria) alocaram-se às amostras de São Paulo (Caucaia do Alto e Paranapiacaba respectivamente) sendo que a segunda, surpreendentemente não teve percentual nenhum de alocação à amostra de Urugua-í-Iguazú. A amostra “grande” de Urubici foi a única que não teve nenhuma amostra “pequena” associada. As alocações probabilísticas de acordo com os valores relativos à distância de Mahalanobis obtidas em 1000 replicações de *bootstrap* de todas amostras pequenas pode ser verificada na tabela 6.

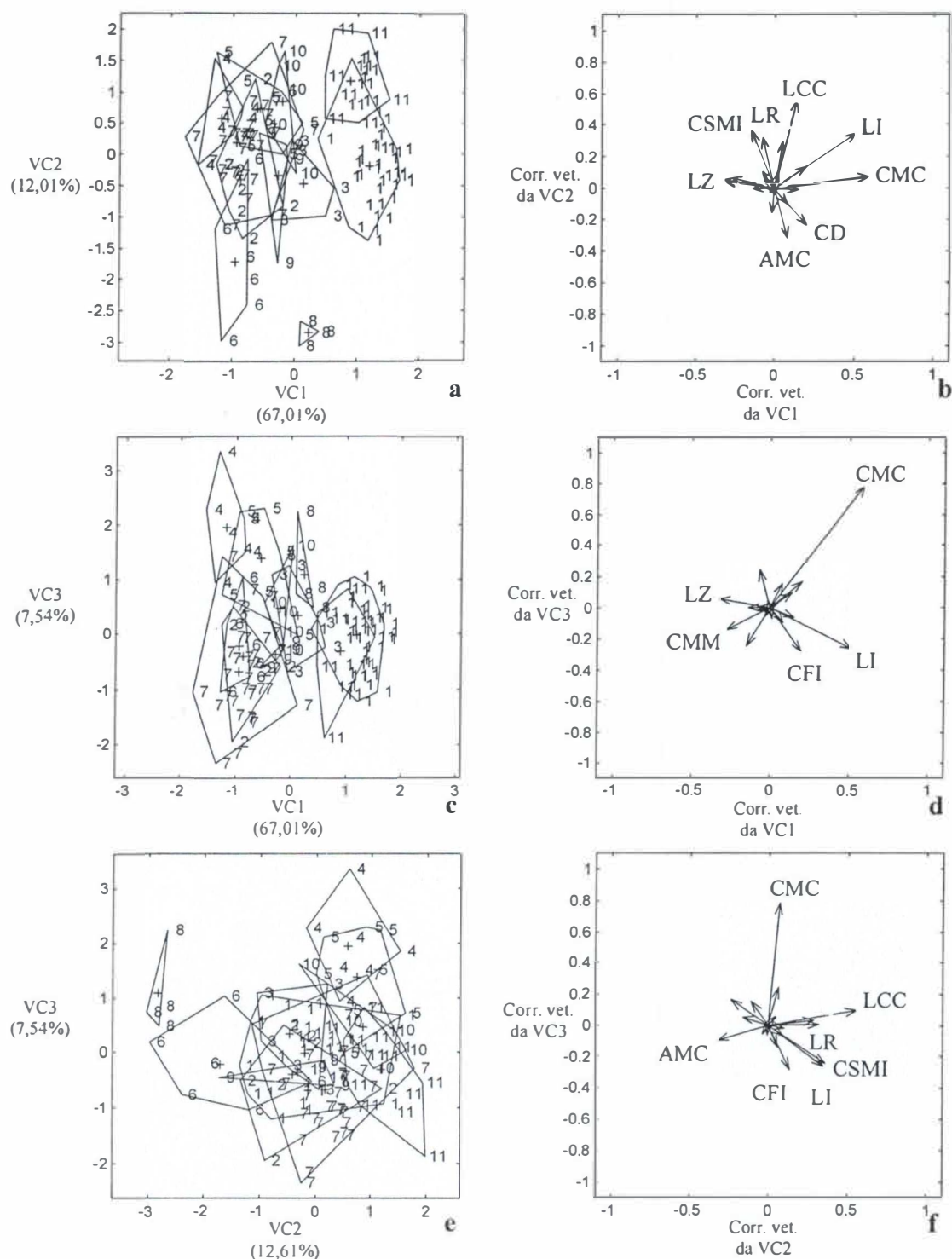


Figura 6. Diagrama da distribuição dos escores individuais interpolados de cada amostra “grande” no espaço multivariado definido pelas variáveis canônicas (VC) (à esquerda), e suas correlações vetoriais (à direita). Entre parêntesis os percentuais de variação de cada VC. Números nas figuras indicam a área referente aos escores dos indivíduos de cada uma das amostras grandes: 1-Brejo da Lapa, MG; 2-Caucaia do Alto, SP; 3-Torres, RS; 4-Uruguá-Iguazú, ARG; 5-Aratiba, RS; 6-Ortigueira, PR; 7-Paranapiacaba, SP; 8-Urubici, SC; 9-Bananal, SP; 10-Caldas da Imperatriz, SC e 11-Vale das Antas, RJ.

Tabela 6. Probabilidades de alocação (%) das amostras “pequenas” (linhas) às amostras “grandes” (colunas) baseadas na frequência de ocorrência das menores distâncias de Mahalanobis obtidos em 1000 replicações de *bootstrap*. Valores em negrito indicam as maiores frequências relativas de alocação.

	Vale das Antas RJ	Brejo da Lapa MG	Caucaia do Alto SP	Parana-piacaba SP	Bananal SP	Ortigueira		Urubici SC	Caldas da Imperatriz		Torres		Aratiba		Urugua-í Iguazú AR	
						PR	RS		SC	RS	RS	AR	RS	AR		
Alto Caparaó MG	55,34	41,16	-	-	-	-	-	-	3,50	-	-	-	-	-	-	-
N. Friburgo RJ	81,22	-	-	-	6,09	-	-	-	12,19	-	-	-	0,50	-	-	-
Teresópolis RJ	1,40	98,30	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Itamonte MG	16,98	83,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casa Grande SP	5,39	-	-	0,10	61,64	-	-	-	27,47	0,40	5,00	-	-	-	-	-
Cotia SP	-	-	-	98,80	-	-	-	-	1,20	-	-	-	-	-	-	-
Onça Parda SP	-	-	26,57	73,33	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
São Bernardo SP	-	-	1,90	97,10	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telem. Borba PR	-	-	0,50	99,30	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piraquara PR	-	-	70,53	2,50	3,80	23,07	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-
Sapiranga RS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
Osório RS	-	-	-	0,30	-	23,38	-	-	3,40	36,76	0,40	35,76	-	-	-	-
Maquiné RS	-	-	1,30	-	-	-	-	-	1,50	-	97,20	-	-	-	-	-
Apar. da Serra RS	0,30	-	-	-	-	-	-	-	69,33	-	30,37	-	-	-	-	-
Serra Geral RS	0,10	-	1,40	0,50	-	-	-	-	83,82	11,58	2,60	-	-	-	-	-
Dos de Mayo AR	-	-	40,76	9,49	-	-	-	-	-	-	25,67	24,08	-	-	-	-
S. La Victoria AR	-	-	35,56	64,04	-	-	-	-	0,20	0,10	0,10	-	-	-	-	-

3.2. Análises citogenéticas

Os três indivíduos cariotipados, JAO 967 (Piraquara, PR), PRG 1117 e 1192 (Alto Caparaó, MG), mostraram um número diplóide de 52 e número fundamental autossômico de 52 (Fig. 7). O complemento autossômico é composto por 24 pares de cromossomos acrocêntricos variando em tamanho de grande a pequeno e um par de pequenos metacêntricos. O cromossomo X é um acrocêntrico médio e o cromossomo Y um acrocêntrico pequeno.

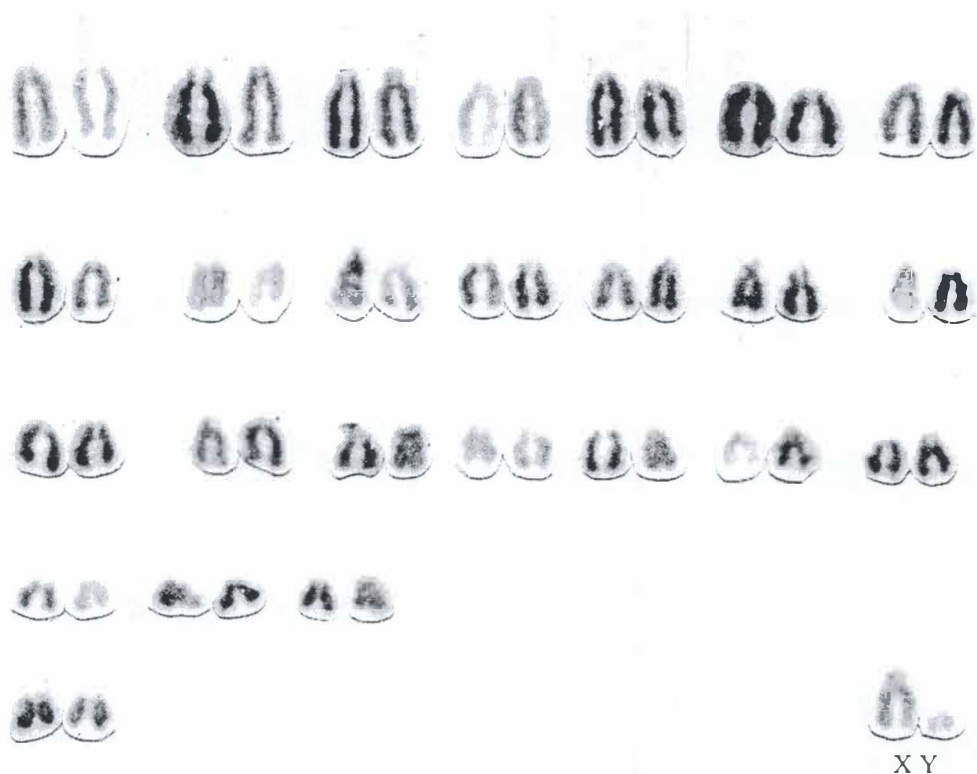


Figura 7. Coloração convencional com Giemsa do cariótipo de *Bucepattersonius* sp. (♂ JAO 967) de Piraquara, PR. $2n = 52$, $NFa = 52$. XY cromossomos sexuais.

3.3. Análises moleculares

Quarenta e seis amostras tiveram todo o gene *cit-b* amplificado. A lista dos espécimes com o número de museu, número original e o número de pares de base sequenciados de cada uma destas amostras está na tabela 7.

Tabela 7. Lista das amostras seqüenciados neste estudo indicando o número de museu, número original e o número de pares de bases (pb) seqüenciados, especificando a base de início, interrupção e fim.

Nº de museu	Nº original	Nº de pb	Início	Interrupção	Fim
MN 60590	CRB 1291	793	1	-	793
MN 60591	CRB 1292	988	14	-	1001
MN 60592	CRB 1299	585	30	-	614
MN 47456	CRB 1300	1132	9	-	1140
MN 47457	CRB 1301	1140	1	-	1140
MN 47460	CRB 1310	1015	1	-	1015
MN 60593	CRB 1312	1140	1	-	1140
-	CRB 1319	709	32	-	740
MN 60600	CRB 1331	1140	1	-	1140
MN 60606	CRB 1334	568	13	-	580
MN 60602	CRB 1337	1062	1	-	1062
MN 60603	CRB 1338	1025	1	-	1025
MN 47461	CRB 1340	1133	8	-	1140
MN 60605	CRB 1344	1127	14	-	1140
MN 47462	CRB 1353	839	1	-	839
MN 47463	CRB 1354	1085	8	-	1092
MN 47465	CRB 1356	902	14	-	915
MN 47466	CRB 1357	828	14	-	842
MN 62124	CRB 1913	702	1	-	702
-	CRB 1944*	224	1	-	224
-	PH 10184	594	88	-	681
MN 30017	PH 10218*	435	648	-	1082
-	PH 10246	889	100	485 a 638	1140
-	PRG 1117*	379	648	-	1026

* não incluído nas análises moleculares

Tabela 7. (Continuação) Lista das amostras seqüenciados neste estudo indicando o número de museu, número original e o número de pares de bases (pb) seqüenciados, especificando a base de início, interrupção e fim.

Nº de museu	Nº original	Nº de pb	início	interrupção	fim
-	VPF 82	941	7	-	947
-	VPF 86	1046	11	-	1056
-	VPF 298	790	1	-	790
MN 48018	LG 108	1119	25	-	1140
MN 48019	LG 111	950	111	-	963
MN 48016	LG 123	686	25	-	707
-	LG 203	974	1	-	974
-	LG 204	784	5	-	788
-	JAO967*	306	648	-	953
-	VA 48	1043	1	-	1043
-	VA 104	927	1	-	927
-	VA 112	697	1	-	697
-	VA 116	789	1	-	789
-	VA 117	927	1	-	927
-	VA 120	817	1	-	817
-	VA 125	800	1	-	800
-	VA 129	936	1	-	936
-	VA133	1041	2	-	1042
-	LMT 391*	559	107	-	665
-	LMT 399	843	36	-	878

* não incluído nas análises moleculares

A estimativa de distância genética revelou cinco agrupamentos: (A) três indivíduos de Caparaó, com uma estimativa de distância p média de 0,9% (mínimo de 0,7% e máximo de 1,2%), (B) 35 indivíduos da Serra dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira (excetuando-se o espécime LG 123 de Itamonte) com estimativa de distância p média de 0,8% (mínimo de 0,1% e máximo de 3,3%), (C) dois indivíduos de São Paulo (MAM 342 e MAM 383) com distância de 1,1% entre si, e um indivíduo de Itamonte (LG123) com distâncias de 2,2% e 1,3% dos indivíduos de São Paulo. Dois indivíduos (CRB1913 e LMT399) são

geneticamente distantes entre si e do restante das amostras e foram considerados como representantes de duas linhagens distintas (Linhagens D e E, Tab. 8).

As seqüências de 914pb obtidas dos indivíduos da Serra dos Órgãos, VA104, VA116 e VA125, foram iguais. Também houve compartilhamento de três haplótipos entre indivíduos da Serra da Mantiqueira, o primeiro compartilhado por CRB 1291, 1338, 1344 e LG 204, o segundo compartilhado por CRB 1312, 1353, 1354 e VPF 82, e o terceiro compartilhado por CRB 1331 e MF 12 (Tab. 8).

Tabela 8. Estimativas de distância p, em negrito estimativas entre espécimes da mesma localidade, nas células sombreadas estimativas entre espécimes supostamente da mesma espécie. Letras nos quadrados indicam as linhagens apontadas nas outras análises moleculares. Haplótipos iguais foram representados apenas uma vez e estão relacionados no texto.

	táxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
1	PHI0184																																		
2	PHI0186	.009																																	
3	PHI0246	.012	.007																																
4	VPF298	.061	.061	.065																															
5	VA48	.059	.060	.072	.009																														
6	VA104	.059	.060	.074	.008	.002																													
7	VA112	.062	.064	.065	.007	.004	.003																												
8	VA117	.061	.062	.077	.009	.009	.007	.007																											
9	VA120	.059	.060	.065	.005	.005	.002	.003	.004																										
10	VA129	.061	.062	.078	.013	.011	.011	.012	.004	.007																									
11	VA133	.059	.060	.074	.01	.003	.003	.007	.010	.006	.008																								
12	CRB1291	.059	.058	.061	.021	.023	.022	.020	.023	.019	.027	.026																							
13	CRB1292	.051	.052	.064	.021	.024	.024	.021	.026	.020	.031	.027	.006																						
14	CRB1299	.065	.064	.065	.022	.022	.021	.021	.022	.017	.024	.022	.003	.010																					
15	CRB1300	.059	.057	.065	.021	.024	.024	.021	.026	.019	.031	.027	.009	.012	.009																				
16	CRB1301	.054	.056	.067	.023	.026	.026	.023	.028	.022	.033	.030	.008	.003	.009	.013																			
17	CRB1310	.059	.059	.065	.022	.024	.024	.022	.026	.021	.031	.027	.006	.010	.009	.011	.007																		
18	CRB1312	.056	.056	.065	.019	.022	.022	.019	.024	.019	.028	.025	.006	.008	.007	.008	.009	.005																	
19	CRB1319	.052	.056	.059	.023	.024	.023	.021	.024	.020	.025	.024	.007	.003	.009	.010	.004	.011	.008																
20	CRB1331	.052	.053	.064	.021	.024	.024	.020	.026	.020	.031	.027	.005	.001	.009	.011	.002	.009	.007	.001															
21	CRB1334	.061	.058	.060	.025	.025	.023	.023	.025	.019	.030	.028	.012	.012	.011	.011	.014	.011	.009	.011	.014														
22	CRB1337	.054	.053	.065	.022	.023	.025	.022	.027	.021	.030	.026	.008	.003	.010	.013	.004	.011	.009	.004	.002	.016													
23	CRB1340	.059	.056	.065	.022	.023	.023	.022	.025	.020	.030	.026	.012	.010	.012	.008	.013	.010	.007	.013	.011	.011	.011												
24	CRB1356	.054	.056	.068	.024	.027	.027	.025	.029	.024	.033	.030	.009	.002	.010	.013	.001	.008	.010	.006	.003	.012	.006	.012											
25	CRB1357	.057	.057	.061	.021	.023	.023	.020	.025	.020	.029	.027	.008	.006	.010	.006	.010	.008	.005	.010	.007	.009	.010	.005	.008										
26	VPF86	.056	.056	.064	.021	.022	.022	.019	.024	.019	.028	.025	.009	.010	.010	.005	.011	.009	.007	.008	.009	.012	.011	.005	.012	.006									
27	LG108	.052	.053	.064	.022	.026	.026	.022	.028	.021	.030	.027	.007	.002	.010	.012	.003	.010	.008	.003	.001	.013	.003	.012	.004	.009	.010								
28	LG111	.056	.055	.062	.021	.022	.022	.020	.024	.019	.028	.025	.009	.010	.012	.005	.011	.009	.005	.010	.009	.014	.011	.002	.012	.005	.002	.010							
29	LG203	.059	.056	.065	.021	.023	.023	.020	.025	.019	.030	.026	.001	.009	.003	.010	.010	.008	.008	.007	.008	.012	.010	.010	.011	.010	.008	.009	.008						
30	LG123	.076	.073	.068	.075	.075	.073	.076	.075	.073	.076	.075	.069	.066	.075	.072	.069	.070	.070	.067	.066	.072	.069	.075	.070	.072	.070	.066	.072	.069					
31	MAM342	.084	.076	.075	.084	.088	.088	.085	.090	.082	.094	.091	.081	.076	.087	.082	.080	.082	.080	.079	.078	.078	.080	.080	.079	.077	.078	.079	.080	.081	.022				
32	MAM383	.084	.074	.078	.082	.088	.088	.085	.090	.081	.094	.091	.079	.076	.087	.082	.080	.082	.080	.078	.078	.081	.080	.080	.079	.076	.078	.079	.080	.081	.013	.011			
33	CRB1913	.079	.080	.075	.090	.090	.089	.091	.087	.089	.091	.093	.083	.074	.087	.086	.080	.087	.084	.077	.077	.085	.080	.086	.078	.083	.084	.078	.086	.083	.061	.060	.057		
34	LMT399	.071	.067	.078	.070	.068	.068	.073	.065	.064	.067	.069	.071	.062	.074	.068	.068	.070	.068	.071	.065	.068	.068	.068	.067	.071	.068	.064	.068	.068	.083	.080	.080	.081	

C

D

E

As análises de agrupamentos vizinhos (Fig. 8), parcimônia máxima (Fig. 9) e verossimilhança máxima (Fig. 10) mostraram resultados congruentes confirmando a monofilia de *Brucepattersonius*. Houve a separação clara dos Neotominae do clado dos Akodontini que por sua vez apresentou o clado monofilético de *Brucepattersonius* separado dos clados de *Blarinomys* e *Lenoxus*. Dentro de *Brucepattersonius* todas as análises são coincidentes em mostrar a formação de cinco linhagens, identificadas nas figuras 8, 9 e 10: (A) Três indivíduos do Maciço do Caparaó, sendo dois da série-tipo de *B. griserufescens* e um o holótipo de *B. albinasus* (PH 10246); (B) 25 indivíduos da Serra da Mantiqueira (24 haplótipos de Itamonte e um haplótipo de Passa Quatro) e dez indivíduos da Serra dos Órgãos (nove haplótipos do Vale das Antas em Teresópolis e um haplótipo de Nova Friburgo); (C) dois haplótipos de São Paulo (um de Capão Bonito, outro de Biritiba) e um haplótipo da Minas Gerais (Itamonte); (D) um haplótipo do Rio Grande do Sul (Aratiba) e (E) um haplótipo de Santa Catarina (Urubici).

As análises de parcimônia máxima e agrupamentos vizinhos apresentaram topologia similar, com pequenas variações no relacionamento dos haplótipos, definindo o relacionamento entre os integrantes da linhagem B, enquanto a análise de verossimilhança máxima apresentou diferenças maiores. Dentro da linhagem B, as duas primeiras análises revelam dois clados, um correspondendo à Serra dos Órgãos (F) e outro à Serra da Mantiqueira (G) (Figs. 8 e 9). Na análise de verossimilhança máxima parte da linhagem (G) da Serra da Mantiqueira (identificadas como G' e G'' na figura 10) se agrupa com espécimes da Serra dos Órgãos (F), e parte (identificada como G''') fica separada.

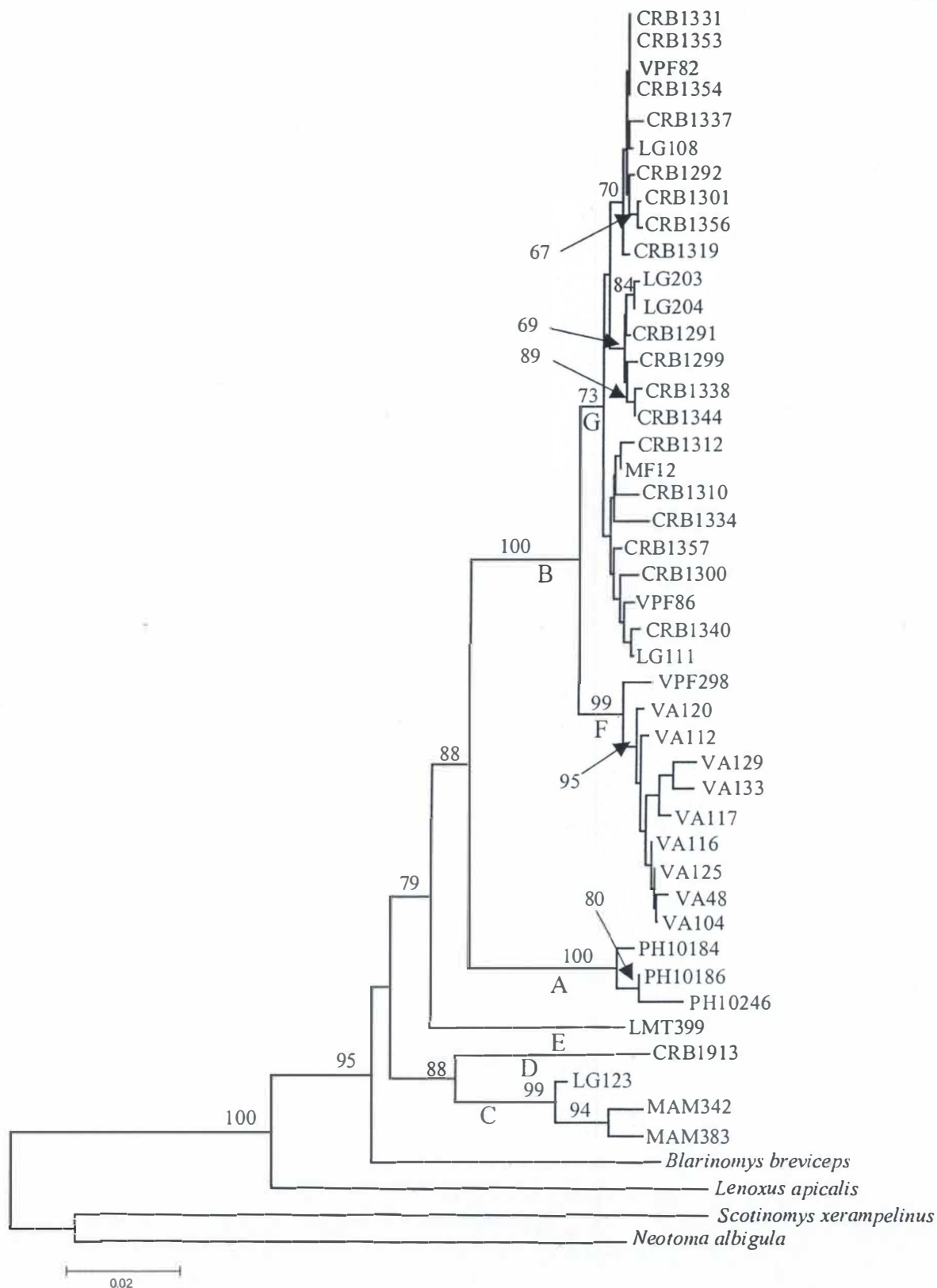


Figura 8. Topologia da análise de agrupamentos vizinhos com modelo de substituição de Kimura 2-parâmetros. Letras sob os ramos indicam os ramos coincidentes nas análises de parcimônia máxima e verossimilhança máxima. Números sobre os ramos se referem aos valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.

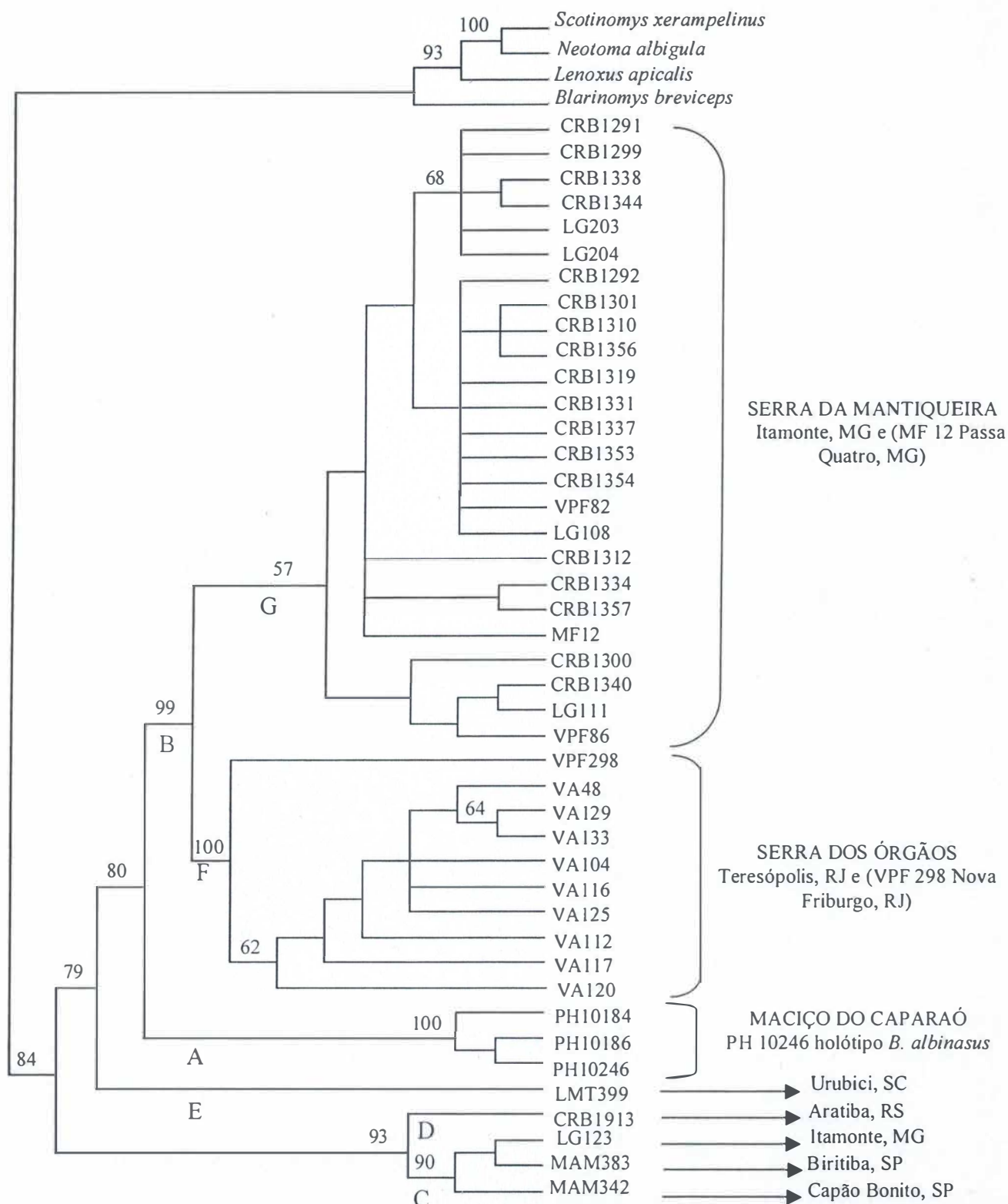


Figura 9. Árvore de consenso estrito das 260434 árvores mais parcimoniosas obtidas com busca heurística, algoritmo de TBR e adições passo-a-passo (10 réplicas). Os valores sobre os ramos são estimativas de *bootstrap* calculadas com base em 160 replicações. Tamanho da árvore=1205, índice de consistência=0,768, índice de homoplasia=0,232, índice de retenção=0,790, índice de consistência reescalonado=0,607. Letras sob os ramos indicam ramos coincidentes com as análises de agrupamentos vizinhos e veross. máxima.

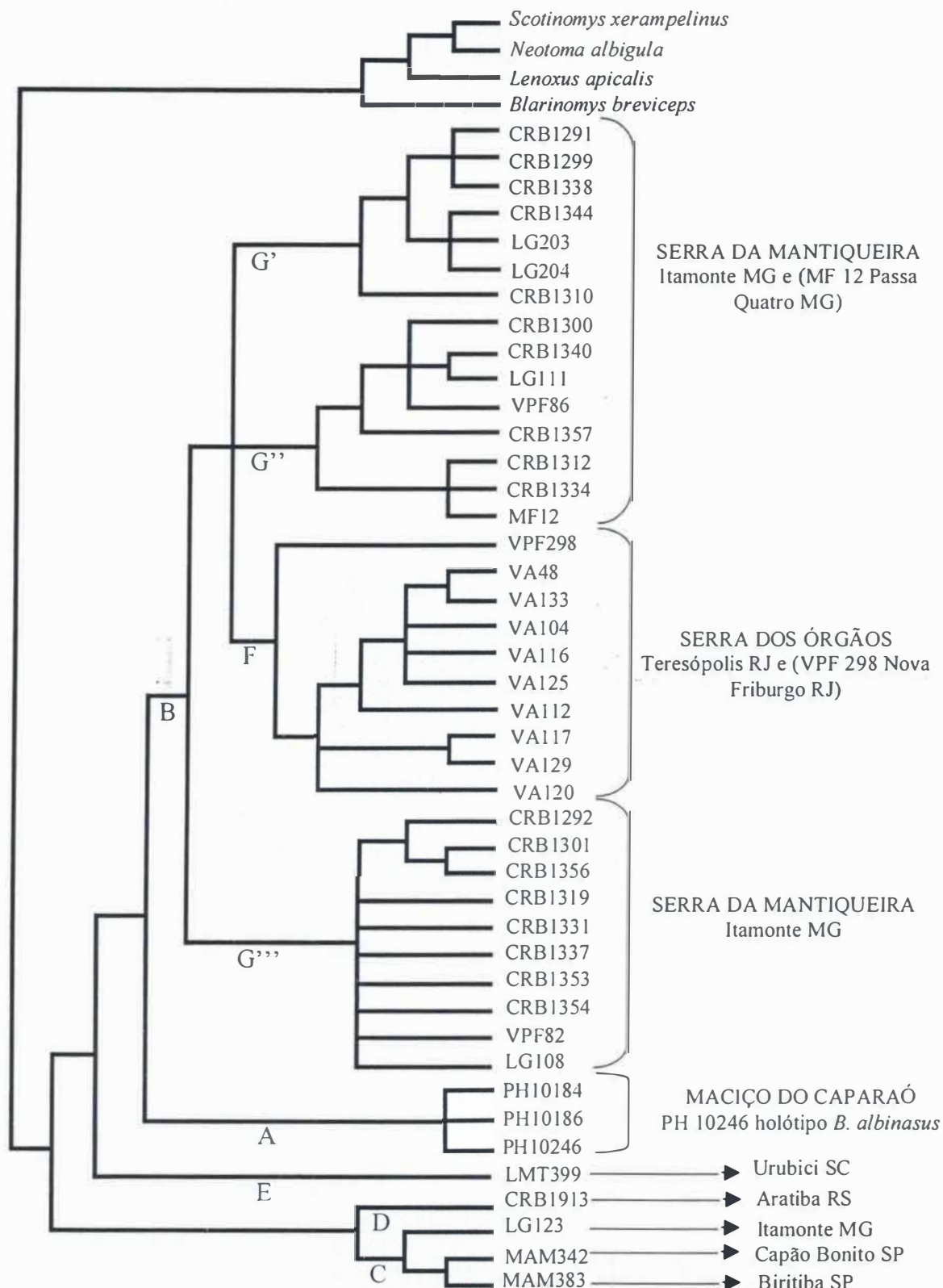


Figura 10. Árvore de verossimilhança máxima gerada seguindo o modelo evolutivo GTR+I+G com busca heurística, algoritmo TBR, adições aleatórias de ramos passo-a-passo baseados em 10 réplicas. Frequências: A=0,30, C=0,31, G=0,13, T=0,26, -Ln l=4207,31, percentual de sítios invariáveis =0,5045. Letras sob os ramos indicam ramos coincidentes com as análises de agrupamentos vizinhos e parcimônia máxima.

3.4. Análises de variação morfológica e molecular dentro das linhagens

Os resultados das análises moleculares apontaram a existência de pelo menos cinco unidades evolutivas (linhagens) nas amostras estudadas. Estes mesmos grupos foram também identificados nas análises morfológicas quando existiam amostras disponíveis (Fig. 12). Para realizar as análises de variação morfológica e molecular foi selecionada a linhagem B por apresentar um número elevado de indivíduos, sendo 10 da Serra dos Órgãos (linhagem F) e 25 Serra da Mantiqueira (linhagem G).

Na análise de verossimilhança máxima (Fig.10) a configuração interna das linhagens F e G foi diferente das verificadas nas análises de agrupamentos vizinhos e parcimônia máxima. A análise de verossimilhança máxima mostrou dois clados, um com parte dos haplótipos da Serra da Mantiqueira (linhagem G'''), e outro com haplótipos das duas serras divididos em três subgrupos (linhagens G', G'' e F). Na análise de agrupamentos vizinhos a relação do haplótipo CRB1310, e na de parcimônia máxima a relação dos haplótipos CRB1310 e 1357 divergiu em relação ao restante das amostras quando comparadas com a análise de verossimilhança máxima (Figs. 8, 9 e 10). As análises morfológicas incluindo todas as amostras "grandes" corroboraram os resultados moleculares das análises de parcimônia e agrupamentos vizinhos com as amostras se agrupando em dois grupos correspondentes às linhagens G e F (Fig. 6).

As análises canônicas discriminantes apontaram uma separação dos indivíduos pertencentes às serras dos Órgãos e da Mantiqueira (linhagens F e G da análise molecular) do restante das amostras em relação à variável canônica 1 (VC1) (Fig. 6 a-d), responsável por 67,01% da explicação da variação entre as amostras. Esta separação também foi verificada nas análises moleculares de agrupamentos vizinhos, parcimônia máxima e verossimilhança máxima. Nestas análises os indivíduos destas duas serras, com exceção do

indivíduo LG123, formaram um grupamento monofilético, além de terem apresentado uma distância genética média de 0,8%, indicando que pertencem à mesma espécie.

Na análise da variação morfológica, os grupos revelados na análise de verossimilhança máxima receberam números referentes aos clados: grupo 1 (clado G') sete indivíduos do Brejo da Lapa; grupo 2 (clado G'') oito indivíduos do Brejo da Lapa e um indivíduo de Passa Quatro; grupo 3 (clado F) nove indivíduos do Vale das Antas e um indivíduo de Nova Friburgo, este último indivíduo teve alocação com as amostras do Vale das Antas em 100 % das interações de *bootstrap* das distâncias de Mahalanobis quando tratada separadamente; e grupo 4 (clado G''') dez indivíduos do Brejo da Lapa (Fig. 10). Os indivíduos da Serra da Mantiqueira e da Serra dos Órgãos que não foram tratados nas análises moleculares não foram incluídos nesta análise. Da mesma forma, o indivíduo LG 123, do Brejo da Lapa, que se revelou como uma diferente espécie (linhagem C) em simpatria, só foi utilizado em caráter comparativo na análise populacional de *median-joining*.

Quando os escores individuais foram interpolados no espaço multivariado definido pelas variáveis canônicas 1 e 2, pôde-se notar um padrão similar ao encontrado na análise que trata estes quatro grupos como duas amostras “grandes”. As amostras da Serra dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira apresentam-se sobrepostas uma à outra, e separadas das demais amostras (Figs. 6 e 11). A separação entre as duas amostras e as restantes se dá com fortes correlações vetoriais positivas para o comprimento máximo do crânio (CMC) como na análise considerando duas amostras “grandes”, mantendo-se a correlação positiva para a largura interorbital (LI) e fraca correlação negativa em relação ao comprimento da série molar inferior (CSMI) (Fig. 11). Verifica-se a uma separação dos indivíduos do Grupo 3 da Serra dos Órgãos dos Grupos 1 e 4, mas uma sobreposição dos indivíduos do grupo 2 com todos os grupos através da variável canônica 2.

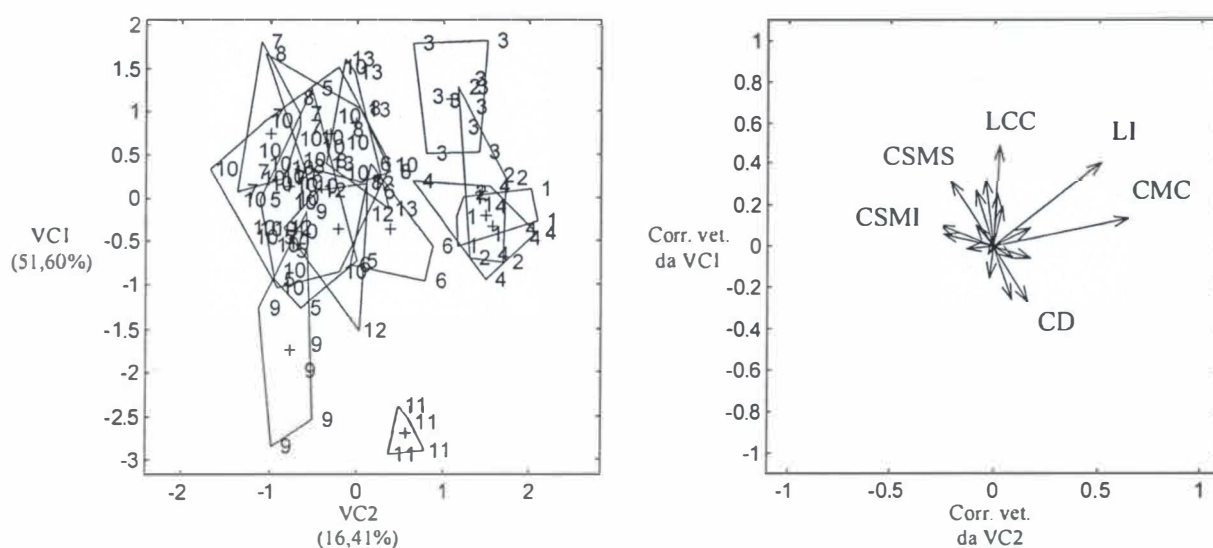


Figura 11. Análise discriminante canônica e correlações vetoriais com as variáveis originais, mostrando a separação dos grupos da Serra da Mantiqueira e Serra dos Órgãos. Pontos numerados 1, 2 e 4 indicam os indivíduos do Brejo da Lapa, MG e 3-Vale das Antas, RJ, os quatro definidos pelas análises moleculares; 5-Caucaia do Alto, SP; 6-Torres, RS; 7- Urugua-í-Iguazú, ARG; 8-Aratiba, RS; 9-Ortigueira, PR; 10-Paranapiacaba, SP; 11-Urubici, SC; 12-Bananal, SP e 13-Caldas da Imperatriz, SC.

Na análise de UPGMA baseada nos dados moleculares pode-se verificar três linhagens distintas: a linhagem 1 composta por indivíduos das serras dos Órgãos e da Mantiqueira, a linhagem 2 com indivíduos de Urubici, SC e a linhagem 3 com indivíduos de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Argentina, esta última se revelando a mais complexa. Dentro da linhagem 3 houve a formação de três grupos menores, um grupo com amostras de São Paulo e Paraná, outro com a amostra de Aratiba junto à amostra da Argentina, e um terceiro com a amostra de Torres junto à amostra de Caldas da Imperatriz (Fig. 12 a).

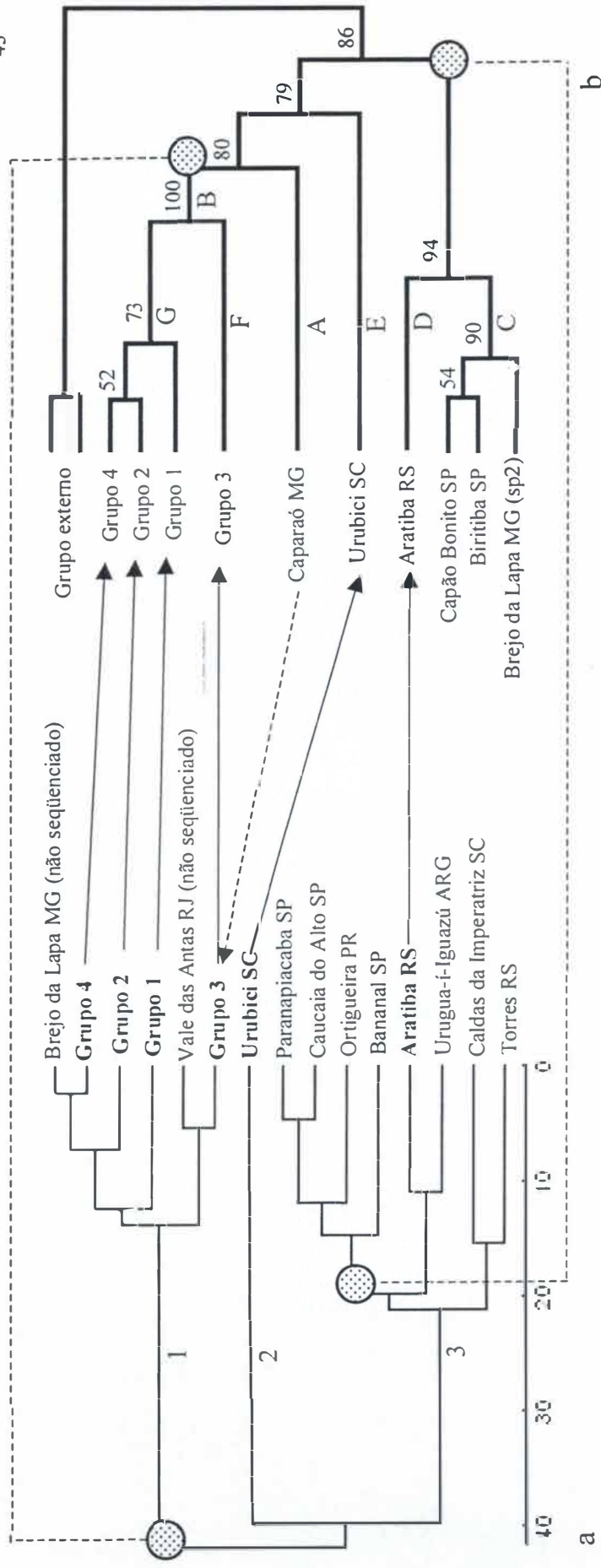


Figura 12. Comparação entre os agrupamentos formados pelo método de UPGMA baseado nas distâncias de Mahalanobis (a), e a árvore de parcimônia máxima (b), com apenas alguns táxons representando os agrupamentos gerados pela análise de verossimilhança máxima. Em negrito encontram-se as amostras com indivíduos seqüenciados. Setas indicam correspondência das unidades terminais e setas tracejadas indicam em qual grupo morfológico as amostras referentes às análises moleculares foram probabilisticamente atribuídas. Linhas tracejadas e círculos hachurados indicam o relacionamento dos grupos maiores. Números sobre os nós indicam suporte de *bootstrap* baseado em 1000 réplicas. Números sob os ramos do UPGMA indicam linhagens entre as distâncias 20 e 30 Letras abaixo dos ramos indicam os ramos congruentes às análises originais (agrupamentos vizinhos, parcimônia máxima e verossimilhança máxima).

Estes quatro grupos da Serra da Mantiqueira e da Serra dos Órgãos também apresentaram grande sobreposição em relação aos componentes principais. Há uma ligeira distinção entre os grupos 1 e 3 em relação ao CP2 quando os escores interpolados no espaço multivariado definido pelos CP2 e CP3, responsáveis por 14,51% e 11,37% da explicação da variação. Apesar do CP1 ser responsável por 35,91 % da explicação da variação, não se apresentou como um bom eixo na distinção dos grupos (Fig. 13).

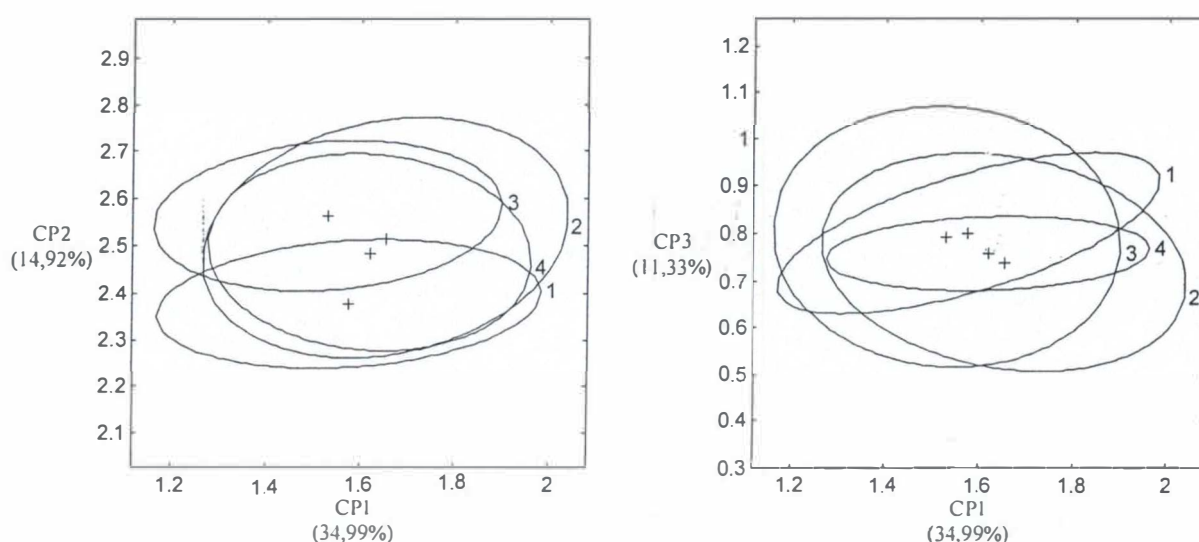


Figura 13. Elipses de 95% do intervalo de confiança dos escores individuais dos quatro grupos da Serra da Mantiqueira e da Serra dos Órgãos baseados na análise molecular.

Quando os escores individuais de cada um dos quatro grupos da Serra da Mantiqueira e da Serra dos Órgãos foram interpolados nos espaços multivariados definidos pelas variáveis canônicas 1, 2 e 3 pode se notar uma separação evidente entre eles. Estas três variáveis canônicas são responsáveis pela explicação de 100% da variação entre as amostras, sendo VC1 = 50,37%, VC2 = 36,70% e VC3 = 12,93% (Fig.14).

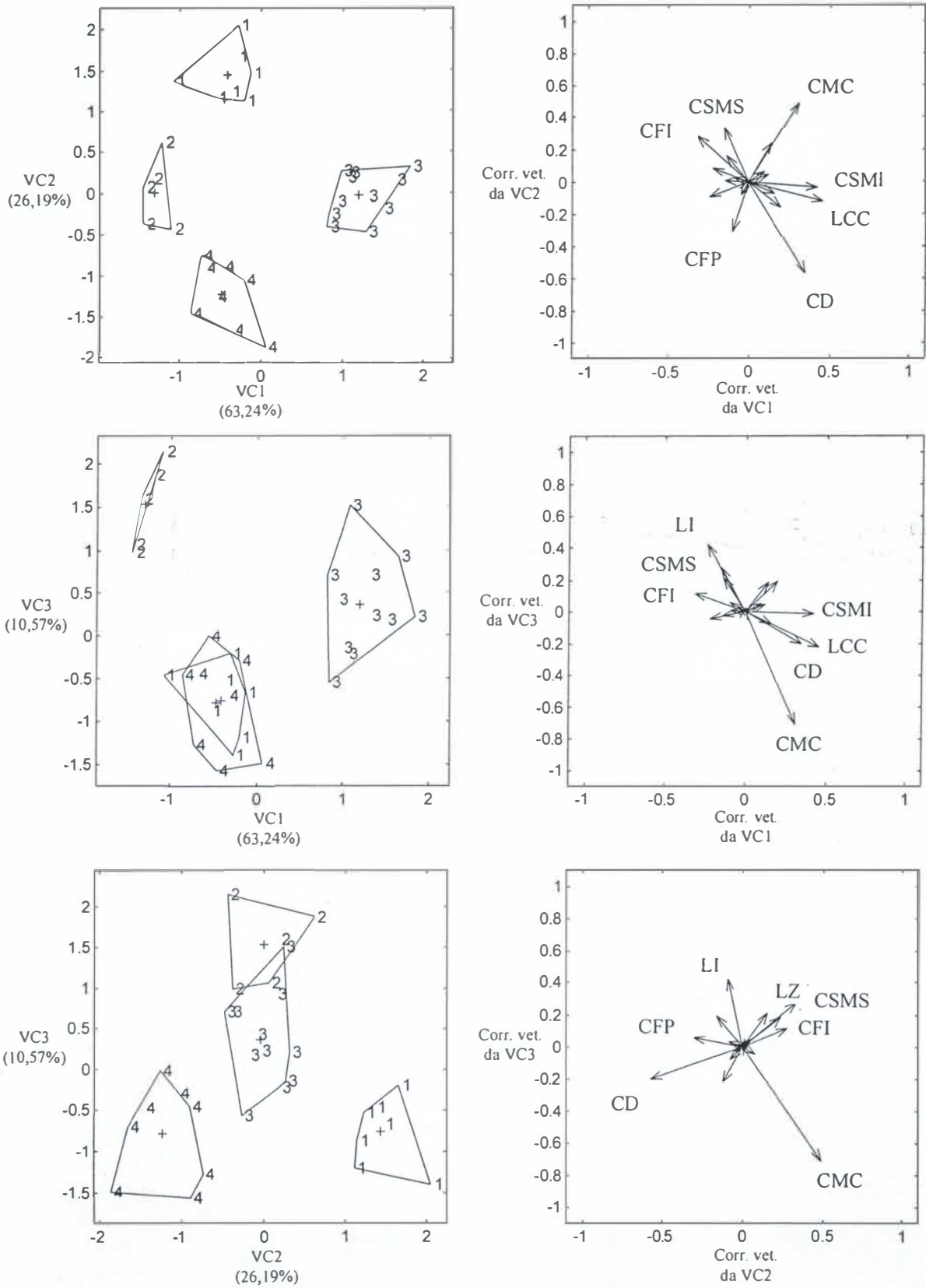


Figura 14. Análises discriminantes canônicas e correlações vetoriais dos quatro grupos baseados nas análises moleculares.

A variável canônica 1 é responsável pela separação dos grupos da Serra da Mantiqueira (grupos 1, 2 e 4) do grupo da Serra dos Órgãos (Grupo 3), havendo nesta separação uma correlação vetorial positiva em relação ao comprimento da série molar inferior (CSMI) e da largura da caixa craniana (LCC), e uma correlação negativa para o comprimento do forame incisivo (CFI). A variável canônica 2 é responsável pela separação dos Grupos 1 e 4 (Serra da Mantiqueira) havendo sobreposição entre as amostras dos grupos 2 (Serra da Mantiqueira) e 3 (Serra dos Órgãos). Essa separação é suportada pela forte correlação vetorial negativa do comprimento do diástema (CD) e uma correlação positiva mais branda do comprimento do forame incisivo (CFI) e do comprimento da série molar superior (CSMS) no caso do grupo 1 e uma correlação negativa fraca do comprimento fronto-parietal (CFP), uma correlação negativa mais forte do comprimento do diastema (CD), e uma forte correlação positiva do comprimento máximo do crânio no caso do grupo 4. Já a VC3 está ligada à separação mais sutil do Grupo 2 (Serra da Mantiqueira) do restante das amostras, havendo uma fraca correlação positiva com a largura interorbital (LI), uma forte correlação negativa com o comprimento máximo do crânio (CMC) (Fig.14).

Nas análises de *median-joining* com os indivíduos das populações da Serra dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira possivelmente da mesma espécie, foi inserido haplótipo LG123, apesar de ser de uma outra espécie, devido a sua origem geográfica a fim de se confirmar o grau de divergência verificado com as estimativas de distância p (Tab. 8). Nesta análise o LG 123 (da Serra da Mantiqueira) divergiu do restante dos haplótipos por 31 transições e cinco transversões. Entre o restante dos haplótipos houve a separação clara das populações da Serra da Mantiqueira e da Serra dos Órgãos por cinco transições e uma transversão, com a presença de vetores médios dentro das duas populações, mas não entre elas (Fig. 15).

Como artefato, devido ao reduzido número de pares de bases utilizadas nesta análise, alguns espécimes da Serra dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira compartilharam haplótipos: (1) VA 48 e 133, (2) VA 104, 116 e 125, (3) CRB 1292 e 1356, (4) CRB 1301, 1319, 1331, 1353, 1354 e VPF 82, (5) por CRB 1291, 1338, 1344, LG 203 e 204, (6) CRB 1312 e MF 12 e (7) CRB 1300 e VPF 86.

Comparando os resultados da análise de *median-joining* com a posição geográfica e o distanciamento entre as trilhas onde foram coletados os indivíduos da Serra da Mantiqueira nota-se que espécimes coletados em trilhas diferentes se agrupam, enquanto nem sem espécimes coletados na mesma trilha estão agrupados, sugerindo uma ampla área de uso para estes animais.

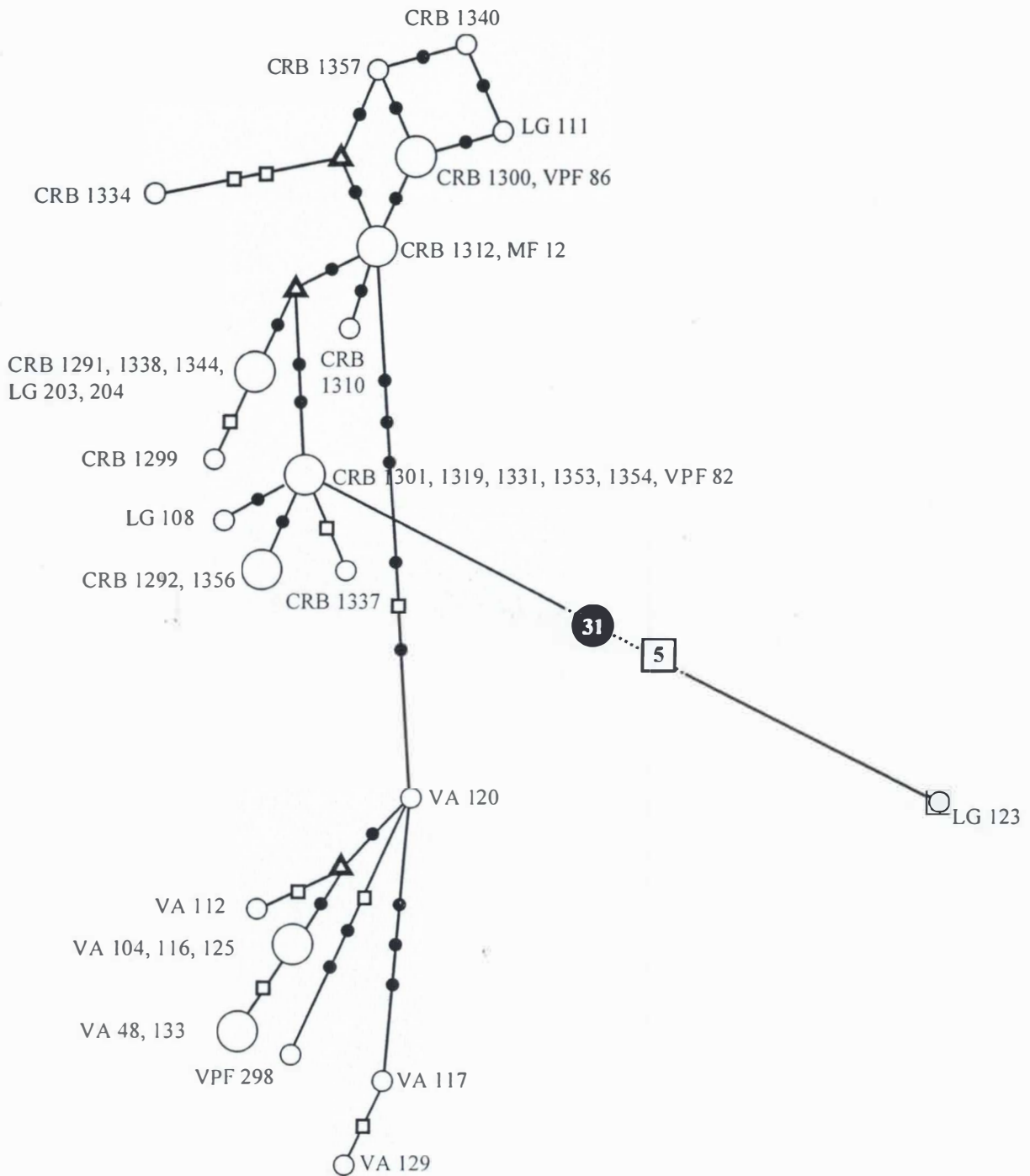


Figura 15. Rede de *median-joining* referente às populações da Serra dos Órgãos e Serra da Mantiqueira definidas como linhagem B, com inclusão do haplótipo LG 123 da linhagem C. Círculos abertos indicam os haplótipos cujo diâmetro é proporcional ao número de espécimes. Círculos fechados indicam transições, quadrados abertos transversões, e triângulos os vetores médios.

4 – Discussão

Os padrões encontrados nas análises morfológicas permitiram a discriminação de diferentes unidades evolutivas, mas os valores brutos das medidas morfológicas das amostras “grandes” (Tab. 2) não possibilitaram a separação dessas unidades taxonômicas. Baseado apenas nas medidas cranianas não foi possível a alocação dos espécimes às espécies de *Brucepattersonius* descritas (HERSHKOVITZ, 1998; MARES & BRAUN, 2000).

Ao se traçar uma linha imaginária entre as distâncias de 20 e 30 no diagrama de UPGMA nota-se a presença de 3 grupos (Fig. 12 a), coincidentes com os resultados da análise discriminante canônica. Comparando-se a análise de parcimônia com um número reduzido de táxons (Fig 12 b) a esta topologia gerada pelo UPGMA (Fig. 12 a), foi possível observar grupamentos comuns (círculos hachurados na figura), apesar de não existir uma equivalência de 100% de ambas abordagens.

Ao se comparar os resultados morfológicos da análise de grupamento (UPGMA) com as linhagens moleculares pode-se sugerir que o grupo formado pelos indivíduos de São Paulo e Paraná façam parte da linhagem molecular C, e os indivíduos de Urugua-í-Iguazú, que se agrupam com a amostra de Aratiba, façam parte da linhagem molecular D (Fig. 12).

As amostras “pequenas” de Dos de Mayo e Serra de La Victoria alocaram-se na maioria das interações de bootstrap às amostras de São Paulo. O fato de apenas uma destas amostras ter-se alocado à amostra “grande” de Urugua-i Iguazú, e mesmo assim com uma baixa frequência, sugere a ocorrência de pelo menos duas unidades evolutivas independentes em Misiones, Argentina. Estes achados tem respaldo no fato de MARES & BRAUN (2000) descreveram três espécies para esta mesma província, no departamento

Guarani. Embora não tenha sido possível analisar espécimes inequivocamente atribuíveis àquelas espécies, é provável que duas delas estejam representadas nas amostras de Misiones utilizadas no presente estudo.

Em um nível maior de similaridade no dendrograma de UPGMA (Fig. 12a) são reveladas cinco linhagens, o que se aproxima do resultado verificado nas análises moleculares. Porém vale ressaltar que não há correspondência total entre estas linhagens uma vez que nem todas amostras foram tratadas em ambas abordagens.

Os dados cariológicos deste estudo corroboram estudos prévios em que foi sugerida a homogenidade cariotípica das espécies de *Bucepattersonius*, com um número diplóide de 52 e um número fundamental autossômico de 52 (SVARTMAN & CARDOSO DE ALMEIDA, 1993; MARES & BROWN, 2000), não se revelando diferenças cariotípicas entre as linhagens estudadas até o momento. A única exceção é um polimorfismo de inversão envolvendo um par de metacêntricos pequenos, resultando em um FNa de 53, descrito para exemplares de Itamonte (BONVICINO *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos através das distâncias genéticas e análises moleculares de agrupamentos vizinhos, parcimônia máxima e verossimilhança máxima sugerem a presença de ao menos cinco linhagens evolutivas independentes dentro do gênero *Bucepattersonius* no Brasil.

Na linhagem A, as análises de parcimônia máxima, verossimilhança máxima e agrupamentos vizinhos mostraram os haplótipos de *B. griserufescens* e *B. albinaus* (holótipo) como parafiléticos ou colapsados. Este resultado, que se repetiu em todas as análises moleculares, o fraco suporte de caracteres distintivos para esta espécie descrita para esta localidade por HERSHKOVITZ (1998) com base em apenas um exemplar, sugerem que *B. albinaus* constitua-se em um sinônimo-júnior de *B. griserufescens*. Embora descritos no mesmo artigo, *B. albinaus* foi descrito em seguida à *B.*

griserufescens. Esta hipótese necessita ser reavaliada com base em outros genes uma vez que não se pode descartar a hipótese de um polimorfismo ancestral que poderia ter-se mantido em *B. albinasus*.

A pequena amostra do Caparaó disponível às análises morfométricas neste estudo (associada à linhagem molecular A) se aloca às amostras “grandes” da Serra dos Órgãos (Vale das Antas) e da Serra da Mantiqueira (Brejo da Lapa) (Tab. 6), sugerindo a proximidade evolutiva destas duas linhagens (Fig. 12). As análises moleculares também posicionam a linhagem A como grupo irmão da linhagem B, mas a média da estimativa de distância p entre elas (aproximadamente 6%) sugere que pertençam a duas linhagens evolutivas (Tab.8).

Dentro da linhagem B as análises de parcimônia máxima e agrupamentos vizinhos mostram um padrão geográfico, com os espécimes de cada serra (Órgãos e Mantiqueira) formando grupos separados por pequenas estimativas de distância (2 a 3 %). Na análise de verossimilhança máxima o padrão encontrado é diferente, com dois grupamentos sendo formados, um deles com indivíduos de ambas as serras, ainda que neste os haplótipos de cada serra estejam separados. Todas estas análises são coincidentes em sugerir que estes haplótipos da linhagem B fazem parte de uma mesma espécie. Indivíduos pertencentes à linhagem B oriundos da Serra da Mantiqueira previamente identificados como *B. griserufescens* (BONVICINO *et al.*, 1998) pertencem a uma entidade taxonômica ainda não descrita.

Em relação à linhagem C, as análises de parcimônia máxima, verossimilhança máxima e agrupamentos vizinhos foram coincidentes em mostrar os haplótipos de São Paulo (Biritiba e Capão Bonito) agrupados com o de Minas Gerais (Itamonte, LG123). Esta topologia aliada aos resultados da estimativa de distância p (em média 1,5%) entre eles sugere que estes três indivíduos pertençam a uma mesma espécie. A relação entre

estes três haplótipos já havia sido verificada por SMITH & PATTON (1999), apesar das respectivas seqüências encontrarem-se associadas à diferentes espécies no GenBank. O haplótipo de Capão Bonito (MAM 342) foi associado a *Oxymycterus iheringi* e o de Biritiba (MAM 383) a *B. soricinus*, apesar da localidade de coleta de MAM 342 ser muito mais próxima à localidade-tipo de *B. soricinus*. Dada a proximidade entre as localidades-tipo de *B. soricinus* e de *B. igniventris* bem como a ausência de uma separação clara entre as amostras de São Paulo nas análises morfológicas multivariadas deste estudo (Figs. 6, 11 e 12), não foi possível chegar a uma associação inequívoca destes espécimes sequenciados a uma das formas nominais disponíveis. Para isso seria necessário uma análise morfométrica incluindo amostras maiores e os tipos de cada espécie, e análises moleculares contendo haplótipos das localidades-tipo.

A linhagem D nas análises moleculares, revelada por um único espécime (Aratiba, RS), é representada por 10 espécimes nas análises morfológicas. Esta amostra se agrupa nas análises morfométricas com a amostra de Misiones, Argentina, sugerindo a associação da linhagem D com uma das espécies reveladas para Misiones.

A linhagem E, de Urubici, SC, com um haplótipo nas análises moleculares e quatro indivíduos nas análises morfológicas constituiu-se em uma unidade distinta em ambas análises, sem que fosse possível associá-la a qualquer espécie descrita. Suas medidas cranianas são distintas das obtidas para as demais amostras estudadas (Tab. 5), e das reportadas nas descrições das espécies de *Bucepattersonius*. As relações filogenéticas desta linhagem, reveladas pelas análises moleculares, não são entretanto, coincidentes com os agrupamentos de UPGMA baseados nas distâncias de Mahalanobis (Fig. 12 a). Nesta análise a amostra de Urubici está mais próxima morfometricamente às amostras de São Paulo + Sul do Brasil + Argentina (Fig. 12 a), ao passo que na análise molecular ela

aparece como grupo-irmão das linhagens A e B, compostas respectivamente por indivíduos de Caparaó e da Serra dos Órgãos + Serra da Mantiqueira (Fig. 12 b).

A análise populacional de *median-joining* com espécimes da linhagem B (Fig. 15) reforça os resultados obtidos nas análises morfológicas e corrobora os dados das análises de parcimônia máxima e agrupamentos vizinhos, mostrando uma estruturação populacional em relação à origem geográfica. A presença de dois vetores médios na análise de *median-joining* é interpretada como um haplótipo não amostrado ou extinto, evidenciando a diversidade genética dentro desta linhagem. Os resultados da análise de *median-joining* com a inclusão do indivíduo da linhagem C (LG123) corrobora os dados das análises de parcimônia máxima, agrupamentos vizinhos e verossimilhança máxima, sugerindo a ocorrência de simpatria na Serra da Mantiqueira, já que o haplótipo LG123 se separa dos demais haplótipos da linhagem B pela presença de 5 transversões e 31 transições.

Apesar da ampla cobertura geográfica deste estudo, não é possível garantir que todas as formas nominais descritas tenham sido amostradas. As unidades taxonômicas reveladas apresentaram uma forte estruturação geográfica. O grupo mais basal do gênero apresenta distribuição predominantemente ao sul, com amostras no Rio Grande do Sul e Misiones, São Paulo, sendo a amostra da Serra da Mantiqueira uma extensão norte desta forma; uma forma isolada em altitude em uma serra litorânea em Santa Catarina; e um grupo mais derivado com indivíduos do Maciço do Caparaó, da Serras dos Órgãos e da Serra da Mantiqueira.

O padrão de distribuição do gênero *Brucepattersonius*, restrito às formações específicas dentro da floresta Atlântica, pode ser interpretado à luz de hipóteses prévias. REIG (1984) sugere a dispersão dos gêneros akodontinos a partir de um clado andino tendo uma direção sul – norte. Esta hipótese é corroborada pelo fato dos grupamentos mais basais de *Brucepattersonius*, nas análises moleculares e morfológicas, serem formados por

amostras de localidades do sul do Brasil e da Argentina, local de possível origem da dispersão dos akodontinos.

O gênero *Bucepattersonius* ocorre desde quase ao nível do mar (p.ex. *B. iheringi* em sua descrição original) até 2.400 m de altitude em Caparaó (verificado neste estudo e por BONVICINO *et al.*, 1997). Outros estudos consideram *Bucepattersonius* como um gênero aparentemente relacionado apenas a altitudes elevadas (OLIVEIRA & BONVICINO, 2002). Outros gêneros de roedores com tolerância a uma ampla variação altitudinal são *Delomys*, com *D. colinus* presente apenas no Maciço do Caparaó e na Serra da Mantiqueira, e *D. sublineatus*, relacionado a regiões mais baixas (BONVICINO & GEISE, 1995), *Akodon* e *Oxymycterus* estes últimos com várias espécies, sendo algumas delas restritas a altitudes elevadas (BONVICINO *et al.*, 1997, HERSHKOVITZ, 1998).

Este estudo corrobora evidências anteriores da região de Floresta Atlântica ser um importante centro geográfico da diversificação de roedores sigmodontinos e marsupiais (MUSTRANGI & PATTON, 1997; SMITH & PATTON, 1999).

5 – Conclusões

- (1) São reconhecidas neste trabalho cinco unidades evolutivas independentes no gênero *Brucepattersonius* através das análises de seqüências de ADN do gene mitocondrial citocromo b (cit-b);
- (2) A espécie *B. griserufescens* é reconhecida como a unidade taxonômica do Maciço de Caparaó, e *B. albinasus* considerado seu sinônimo-júnior;
- (3) Aparentemente as amostras das serras dos Órgãos e da Mantiqueira (linhagem B) e a amostra de Urubici (linhagem E) pertencem a duas espécies não descritas;
- (4) Indivíduos de São Paulo (linhagem C) identificados como pertencentes a duas espécies pelos dados do GenBank, representam apenas uma unidade evolutiva.
- (5) O indivíduo de Aratiba, Rio Grande do Sul (linhagem D) parece pertencer a uma das três espécies descritas para a localidade de Guarani na província de Misiones, Argentina.
- (6) É possível detectar dois grupos de espécies: um contendo com espécies predominantemente distribuídas nas áreas mais baixas de Misiones, na Argentina, e na região sul do Brasil estendendo se por São Paulo e parte de Minas Gerais, e outro com espécies endêmicas de altitudes elevadas contendo espécies isoladas no Maciço do Caparaó, nas serras dos Órgãos e Mantiqueira e em Urubici, Santa Catarina.

6 – Bibliografia

- APPLIED BIOSYSTEMS, 1994. **Sequence Navigator, DNA and Protein Comparison Software**. A Division of Perkin–Elmer Corporation.
- BANDELT, H.; FORSTER, P. & RÖHL, A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Phylogenies. **Molecular Biology Evolution**, 16 (1): 37-48.
- BONVICINO, C.R. & GEISE, L., 1995. Taxonomic status of *Delomys dorsalis collinus* Thomas, 1917 (Rodentia, Cricetidae) and description of a new karyotype. **Zeitschrift fur Säugetierkunde**, 60: 124-127.
- BONVICINO, C.R.; LANGGUTH A.; LINDBERGH S.M. & DE PAULA A.C., 1997. An elevational gradient study of small mammals at Caparaó National Park, Southeastern Brazil. **Mammalia**, 61 (4):547-560.
- BONVICINO, C.R.; PENNA-FIRME, V. & SEUÁNEZ, H.N., 1998. The karyotype of *Bucepattersonius griserufescens* Hershkovitz. 1998 (Rodentia, Sigmodontinae) with comments on distribution and taxonomy. **Zeitschrift fur Säugetierkunde**, 63 (6): 329-335.
- BONVICINO, C.R. & MOREIRA, M.A.M., 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on Cytochrome *b* sequence data. **Molecular Phylogenetic Evolution**, 18: 282-292.
- D'ELÍA, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, an with additional comments on historical biogeography. **Cladistics**, 19: 307-323.
- D'ELÍA, G.; GONZÁLEZ, E.M. & PARDIÑAS, U.F.J., 2003. Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. **Zeitschrift fur Säugetierkunde**, 68 (6): 351-364.
- DEMPSTER, A.P.; LAIRD, N.M. & RUBIN, D.B., 1977. Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society, B**, 39: 1-38.
- FARRIS, J.S., 1970. Methods for computing Wagner trees. **Systematic Zoology**, 19: 83-92.
- HERSHKOVITZ, P., 1998. Report on some sigmodontine rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. **Bonner Zoologische Beiträge**, 47 (3-4): 193-256.

- HINOJOSA, F.; ANDERSON, S. & PATTON, J.L., 1987. Two new species of *Oxymycterus* (Rodentia) from Perú and Bolivia. **American Museum Novitates** 2898: 1-17.
- JOLICOEUR, P. & MOSIMANN, J.E., 1960. Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis. **Growth**, 24: 339-354.
- KRUSKAL, J.B., 1956. On the shortest spanning subtree of the graph and the travelling salesman problem. **Proceedings of the American Mathematics Society**, 7: 48-57.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSON, I.B. & NEI, M., 1993. **MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis**, Version 1.02. Pennsylvania State University, University Park.
- MANLY, B.F.J., 1994. *Multivariate statistical methods a primer*. 2nd ed. Chapman & Hall, London, 215 pp.
- MARES, M. & BRAUN, J.K., 2000. Three new species of *Brucepattersonius* (Rodentia: Sigmodontinae) from Misiones province, Argentina. **Occasional Papers Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History**, 9: 1-13.
- MASSOIA, E., 1963. *Oxymycterus iheringi* (Rodentia – Cricetidae). Nueva especie para La Argentina. **Physis**, 24 (67): 129-136.
- MASSOIA, E. & FORNES, A., 1969. Caracteres comunes y distintivos de *Oxymycterus nasutus* (Waterhouse) y *O. iheringi* Thomas (Rodentia, Cricetidae). **Physis**, 28 (77): 315-321.
- MATHWORKS, 1992. **Matlab Reference Guide**. The Mathworks, Inc. Natick, Massachusetts, 548pp.
- MUSTRANGI, M.A. & PATTON, J.L., 1997. Phylogeography and Systematics of the Slender Mouse Opossum *Marmosops* (Marsupialia, Didelphidae). **University of California Publications in Zoology**, 130: 1-86.
- OLIVEIRA, J.A., 1998. **Morphometric assessment of species group in the South American rodent genus *Oxymycterus* (Sigmodontinae), with taxonomic notes based on the analysis of type material**. Texas. Dissertation in Zoology, Texas Tech University, Doctor of Philosophy.
- OLIVEIRA, J.A. & BONVICINO, C.R., 2002. A new species of sigmodontinae rodent from the Atlantic Forest of eastern Brazil. **Acta Theriologica** 47 (3): 307-322.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics Applications Note**, 14 (9): 817-818.

- POSADA, D. & CRANDALL, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**, 16 (1): 37-45.
- REIS S.F., PESSÔA L.M. & STRAUSS R.E. 1990. Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Revista Brasileira de Genética**, 13 (3): 509-520.
- SMITH, M.F. & PATTON, J.L., 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of the Linnean Society**, 50:149-177.
- SMITH, M.F. & PATTON, J.L., 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America; evidence from cytochrome b. **Journal of Mammalian Evolution**, 6: 89-128.
- SALAZAR-BRAVO, J.; DRAGOO, J.W.; TINNIN, D.S. & YATES, T.L., 2001. Phylogeny and Evolution of the Neotropical Rodent genus *Calomys*: Inferences from Mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 20 (2): 173-184.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T., 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 3v.
- SVARTMAN, M.; CARDOSO-DE-ALMEIDA, E.J., 1993. The karyotype of *Oxymycterus* sp. (Cricetidae, Rodentia) from Central Brazil. **Birkhäuser Verlag Basel – Experientia**, 49: 718-720.
- SWOFFORD, D.L., 1993. "PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0b10", Washington: Smithsonian Institution Press.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J. & HILLIS, D.M., 1996. **Phylogenetic Inference**. In: Molecular Systematics.(Hillis, D.M.; Moritz, C. & Mable, B.K.) 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 665pp.
- THOMAS, O., 1896. On new small mammals from the Neotropical region. **Annals and Magazine of Natural History**, 6 (18): 301-314.
- VITULLO, A.D.; MERAMI, M.S. REIG, O.A.; KAJON, A.E.; SCAGLIA, O.; ESPINOZA, M.B. & PEREZ-ZAPATA, A., 1986. Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae). New karyotypes and chromosomal banding patterns of Argentinian and Uruguayan forms. **Journal of Mammalogy**, 67: 69-80.

ANEXO I

Protocolo para cariótipo

Parte I – Obtenção das células em suspensão

Separar para cada animal:

- Uma seringa (3 ou 5 ml) com agulha;
- Um ou dois tubos de centrifuga de 15mL contendo meio de cultura (de acordo com o porte do animal); Para identificação do tubos de centrifuga arranhar e escrever o número de registro no corpo do tubo e colocar uma etiqueta com o mesmo número, na parte superior da tampa
- Placas de Petri;

Meio de cultura: 80% RPMI 1640, 20% soro bovino fetal, colchicina 10^{-6} M (Concentração final), e brometo de etídio $5\mu\text{g}$.

Carnoy : 3 partes de metanol para 1 de ácido acético.

KCl (0,075M) 0,28g em 50ml de água destilada.

Processo

- 1) Retirar o fêmur (dependendo do porte do animal, retirar também a tíbia; no caso dos morcegos, utilizar o úmero) e cortar as epífises;
- 2) Colocar o meio de cultura em uma seringa (cerca de 2mL de cada tubo);
- 3) Tirar a medula injetando o meio de cultura no canal medular e recolhendo o material em uma Placa de Petri;
- 4) Homogeneizar delicadamente o composto meio de cultura / medula utilizando a seringa;
- 5) Passar o composto para o tubo (caso haja mais de um, dividir o conteúdo);
- 6) Adicionar 0,1ml de brometo de etídio em cada 10mL de material;
- 7) Colocar o(s) tubo(s) em banho Maria a 37°C e aguardar duas horas*
- 8) Centrifugar durante cinco minutos a 1500 rpm;
- 9) Desprezar o sobrenadante;
- 10) Adicionar 10ml da solução de KCl;

- 11) Aguardar 30 minutos a temperatura ambiente;
- 12) Pré-fixar adicionando 1mL de Carnoy ;
- 13) Centrifugar durante cinco minutos a 1500rpm;
- 14) Desprezar o sobrenadante;
- 15) Adicionar 10mL de Carnoy;
- 16) Ressuspender (Homogeneizar);
- 17) Repetir as etapas 13 a 16;
- 18) Estocar no freezer. (Caso necessário pode ficar a temperatura ambiente durante a campanha de campo)

*Se não houver banho Maria no local, manter os tubos junto ao corpo.

Parte II – Obtenção dos cariótipos

- 1) Separar os tubos a serem utilizados;
- 2) Separar 1 pipeta Pasteur para CADA número;
- 3) Limpar 2 lâminas para cada número (limpar mais algumas)
- 4) Preparar fixador Carnoy e Metanol 70%;
- 5) Pesar cada dupla de tubos para que tenham o MESMO peso. Não esquecer de pesar a TAMPA junto com o tubo;
- 6) Completar o de menor peso com Carnoy até que se iguale ao peso do outro;
- 7) Centrifugar por 6 minutos a 1500rpm;
- 8) Desprezar o sobrenadante;
- 9) Diluir o material celular do pelet com o Carnoy remanescente, adicionando mais quando necessário (geralmente é preciso);

Preparação das lâminas

- 10) Identificar a lâmina com o número do animal (a grafite);
- 11) Acender o bico de Bunsen;
- 12) Mergulhar a parte útil da lâmina no metanol 70% e retirar o excesso;
- 13) Adicionar 1 gota do material celular no centro da lâmina;
- 14) Flambar a lâmina;
- 15) Levar a lâmina ao microscópio invertido para verificar a concentração das metáfases;

Coloração das lâminas

- 16) Colocar na Tina de Vidro 40ml de Tampão Fosfato (100mM, pH 6,8) e 2ml de Giensa;
- 17) Colocar as lâminas imersas por 10 minutos e lavar com água corrente;
- 18) Secar com papel de filtro (pressionar sobre a lâmina, sem arrastar);
- 19) Levar ao microscópio com câmera para a obtenção de foto das metáfases.
- 20) Montar pelo menos cinco metáfases de cada animal.

ANEXO II

Protocolo para extração de ADN

Parte I – Extração com o procedimento 3 do “GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit”.

As amostras deverão ser frescas, congeladas ou fixadas preferencialmente em álcool.

Lise Celular

- 1) Dispor um jogo de tubos Eppendorf de 1,5mL previamente identificados em uma caixa com gelo;
- 2) Adicionar 600µL da solução de lise em cada tubo Eppendorf de 1,5mL, aguardar a solução ficar turva;
- 3) Adicionar de 10 a 20 mg do tecido e homogeneizar macerando o tecido com a utilização de pequenas estacas de plástico (próprias para o uso) (30-50 estocadas), para tecidos fixados aquecer a 65°C por 15min antes de homogeneizar;
- 4) Adicionar 3µL da solução de Proteinase K (20mg/mL) ao lisado celular e incubar à 55°C por 3h ou *overnight* até o tecido estar completamente dissolvido. **Caso esteja utilizando Proteinase XIV ao invés de Proteinase K, incubar à 37°C.**
- 5) Adicionar 3µL da solução de RNase A ao lisado celular;
- 6) Homogeneizar por inversão a amostra (25 vezes) e incubar à 37°C por 15 a 60 min.

Precipitação Protéica

- 7) Resfriar as amostras à temperatura ambiente;
- 8) Adicionar 200µL de *Protein Precipitation Solution* ao lisado celular tratado com RNase;
- 9) Agitar vigorosamente em alta velocidade no aparelho Vortex[®] por 20 seg., para homogeneizar a solução;
- 10) Centrifugar por 3 min. à 13.000-16.000 x g. O precipitado de proteínas formará um palet;

Precipitação do ADN

- 11) Preparar um novo jogo de tubos de 1,5mL previamente identificados adicionando 600 μ L de Isopropanol 100%;
- 12) Cuidadosamente transferir o sobrenadante, **que contem o ADN**, para estes tubos com Isopropanol e descartar o tubo com o precipitado protéico;
- 13) Homogeneizar por inversão os tubos (Isopropanol + ADN) cerca de 50 vezes até que o ADN apareça como uma nuvem esbranquiçada;
- 14) Centrifugar por 1 min. à 13.000-16.000 x g. O ADN formará um pequeno palet branco;
- 15) Desprezar o sobrenadante e dispor os tubos abertos e invertidos sobre o papel absorvente até estarem completamente secos;
- 16) Adicionar 600 μ L de Etanol 70% fazendo a lavagem do ADN invertendo por várias vezes o tubo;
- 17) Centrifugar por 1 min. à 13.000-16.000 x g;
- 18) Retirar o Etanol cuidadosamente para não deslocar o palet;
- 19) Dispor os tubos abertos e invertidos sobre o papel absorvente até estarem completamente secos (aprox. 15min);

Hidratação do ADN

- 20) Adicionar 100 μ L de H₂O Milli Q® (100 μ L levará uma concentração de 100 μ g/mL para 10 μ g de ADN utilizado);
- 21) Aquecer os tubos em banho maria à 65°C por 1 h ou, alternativamente, deixar em temperatura ambiente por aproximadamente 24h. **Não esquecer de vedar bem os tubos;**
- 22) Armazenar de 2 a 8°C.

Parte II – Técnica de Fenol-Clorofórmio

- 1) Colocar o tecido (sem o álcool) em um cadinho com um pouco de RPMI – aprox. 2mL;
- 2) Macerar o tecido homogeneizando-o com o RPMI;
- 3) Com uma pipeta Pasteur (descartável) transferir para um tubo Falcon de 15mL;
- 4) Completar o volume até 8mL com RPMI e ressuspender;
- 5) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos (1ª);
- 6) Descartar o sobrenadante, acrescentar RPMI até completar 8mL e ressuspender no Vortex®;
- 7) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos (2ª);
- 8) Descartar o sobrenadante, acrescentar RPMI até completar 8mL e ressuspender no Vortex®;
- 9) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos (3ª);
- 10) Descartar o sobrenadante;
- 11) Acrescentar 3mL do tampão de lise de tecido e ressuspender no Vortex®;
- 12) *Tampão de Lise (100mM NaCl, 10mM Tris, pH 7,5, 0,1M EDTA);*
- 13) Adicionar 300mL de SDS a 10%;
- 14) Adicionar 25µL de RNase (10mg/mL);
- 15) Colocar em banho Maria a 37°C e aguardar de 1 a 2 horas;
- 16) Adicionar 15µL de pProteinase K (ou Proteinase XIV) – homogeneizar;
- 17) Lacrar os tubos com Parafilm® e deixar em banho Maria a 37°C *overnight*;

Os procedimentos com fenol e clorofórmio devem ser realizados preferencialmente na capela

- 18) Colocar um volume de fenol e colocar por 10 minutos no agitador (*shaker*);
- 19) Nota: Pipetar o fenol do fundo do vidro - um volume = 6mL;
- 20) Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos;
- 21) Pipetar o sobrenadante (com o ADN) e colocar em outro tubo previamente identificado;
- 22) Adicionar ½ volume de clorofórmio + ½ volume de fenol e colocar por 10 minutos no agitador;

- 23) Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos;
- 24) Retirar o sobrenadante e colocar em outro tubo identificado;
- 25) Adicionar 1 volume de clorofórmio e colocar por 10 minutos no agitador;
- 26) Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos;
- 27) Pipetar o sobrenadante (com o ADN) e colocar em outro tubo previamente identificado;
- 28) Adicionar 2 volumes de etanol absoluto e agitar manualmente;
- 29) Retirar o ADN reservando-o em um tubo Eppendorf® de 1,5mL e lavar com 500µL de álcool 70%;
- 30) Caso necessário, centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos;
- 31) Desprezar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente;
- 32) Ressuspender o ADN em 100µL de H₂O destilada (ou TE);
- 23) Colocar em banho Maria a 37°C por 5 minutos (até o ADN dissolver).

Não esquecer de vedar bem os tubos;

- 24) Armazenar de 2 a 8°C.